



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
AGRÓNOMOS Y DE MONTES**

**Interacciones de *Bactrocera oleae* Gmel. (Mosca del olivo) con
Botryosphaeria dothidea Moug. (Escudete de la aceituna) y
de *Phloeotribus scarabaeoides* Bern. (Barrenillo del olivo)
con *Verticillium dahliae* Kleb. causante de la
Verticilosis del olivo**

TESIS DOCTORAL

DOCTORANDO

IBRAHIM ELDESOUKI ARAFAT

DIRECTORES

Dr. HANI KASSIM ALDEBIS ALBUNNAI

Dr. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ ESCUDERO

Córdoba (España), Noviembre de 2012

TÍTULO: Interacciones de *Bactrocera oleae* Gmel. (Mosca del olivo) con *Botryosphaeria dothidea* Moug. (Escudete de la aceituna) y de *Phloeotribus scarabaeoides* Bern. (Barrenillo del olivo) con *Verticillium dahliae* Kleb. causante de la Verticilosis del olivo

AUTOR: Ibrahim Eldesouki Arafat

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013

Campus de Rabanales Ctra. Nacional IV, Km. 396 A 14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Interacciones de *Bactrocera oleae* Gmel. (Mosca del olivo) con
Botryosphaeria dothidea Moug. (Escudete de la aceituna) y
de *Phloeotribus scarabaeoides* Bern. (Barrenillo del olivo)
con *Verticillium dahliae* Kleb. causante de la
Verticilosis del olivo**

TESIS DOCTORAL

Tesis presentada por IBRAHIM ELDESOUKI ARAFAT en satisfacción de los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba, codirigida por los Doctores D. Hani K. Aldebis Albunnai Profesor de Entomología Agrícola y Forestal del Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales y D. Francisco Javier López Escudero Profesor de Patología Vegetal del Departamento de Agronomía, de la Universidad de Córdoba.

El Doctorando

Ibrahim Eldesouki Arafat

Los Directores

Dr. Hani K. Aldebis Albunnai

Dr. Francisco Javier López Escudero

Córdoba, Noviembre de 2012

D. HANI K. ALDEBIS ALBUNNAI, Profesor de Entomología Agrícola y Forestal del Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la E.T.S.I.A.M. de la Universidad de Córdoba y D. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ ESCUDERO, Profesor de Patología Vegetal del Departamento de Agronomía de la E.T.S.I.A.M. de la Universidad de Córdoba.

INFORMAN:

Que el trabajo “Interacciones de *Bactrocera oleae* Gmel. (Mosca del olivo) con *Botryosphaeria dothidea* Moug. (Escudete de la aceituna) y de *Phloeotribus scarabaeoides* Bern. (Barrenillo del olivo) con *Verticillium dahliae* Kleb. causante de la Verticilosis del olivo”, realizado por IBRAHIM ELDESOUKI ARAFAT bajo nuestra dirección, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Y para que conste se firma el presente informe en Córdoba, a 2 de Noviembre de 2012

Dr. Hani k. Aldebis Albunnai

Dr. Francisco Javier López Escudero



TÍTULO DE LA TESIS:

Interacciones de *Bactrocera oleae* Gmel. (Mosca del olivo) con *Botryosphaeria dothidea* Moug. (Escudete de la aceituna) y de *Phloeotribus scarabaeoides* Bern. (Barrenillo del olivo) con *Verticillium dahliae* Kleb. causante de la Verticilosis del olivo.

DOCTORANDO/A: IBRAHIM ELDESOUKI ARAFAT

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis Doctoral se ha desarrollado de acuerdo al plan de trabajo previsto y con una dedicación completa por parte del doctorando. Se ha revisado convenientemente la bibliografía científica relativa al tema de tesis, se han cubierto los objetivos planteados y se han obtenido resultados de indudable valor en el contexto de la protección de los cultivos.

Las primeras aportaciones relevantes del trabajo de la Tesis han sido presentadas como comunicaciones en congresos nacionales e internacionales. Además de un artículo que ha sido enviado y está pendiente de ser aceptado.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 2 de Noviembre de 2012

Firma del/de los director/es

Fdo.: Hani K. Aldebis Albunnai

Fdo.: Francisco Javier López Escudero

AGRADECIMIENTOS

Terminar una tesis de doctorado es la culminación de largo tiempo de trabajo, estudio y esfuerzo. Sería muy difícil lograrlo si no es con el apoyo y estímulo de muchas personas.

Primero me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis **Dr. HANI KASSIM ALDEBIS ALBUNNAI** y **Dr. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ-ESCUDERO**, a quienes debo la realización del doctorado en una Universidad tan prestigiosa como lo es la Universidad de Córdoba y por creer en mí como futuro investigador. Gracias por su enseñar su metodología, por animarme en los momentos difíciles, y especialmente, por ofreceme su amistad. En ustedes he podido apreciar las cualidades humanas más auténticas, por las que merece la pena ser person.

Un agradecimiento especial al **Dr. ENRIQUE VARGAS OSUNA**, por la colaboración, paciencia, apoyo brindados desde siempre y sobre todo por esa gran amistad que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre. Al **Dr. ANTONIO TRAPERO**, por la valiosa cooperación, sin la cual me sería imposible realizar este trabajo.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional por el Desarrollo (AECID) por su apoyo económico.

A todo el equipo de trabajo del departamento de Entomología Agroforestal y Patología Vegetal de la universidad de Córdoba de España por la disposición y colaboración directa o indirecta en la realización este proyecto.

Finalmente agradezco a las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que hoy vea la luz.

Este trabajo se lo dedico

A mi madre, mis hermanos y mi amigo y profesor Dr. Hani

Resumen

Entre los factores que afectan al agroecosistema del olivar, las plagas y enfermedades ocupan un lugar muy destacado, siendo la mosca del olivo *Bactrocera oleae* y la Verticilosis del olivo causada por el hongo *Verticillium dahliae* los principales agentes que ocasionan importantes pérdidas económicas en los olivares en la zona del mediterráneo.

Las investigaciones planteadas en el presente trabajo pretenden, por un lado, indagar sobre la interacción de los agentes implicados en el desarrollo del Escudete de la aceituna: el hongo *Botryosphaeria dothidea*, la mosca del olivo *B. oleae* y el cecidómido *Prolasioptera berlesiana* conocido como el mosquito de la aceituna. En segundo lugar, se han realizado experimentos encaminados a dilucidar, la posible transmisión de la Verticilosis del olivo por el barrenillo *Phloeotribus scarabaeoides*.

El estudio relacionado con el Escudete se llevó a cabo durante los años 2009, 2010 y 2011 en un olivar del IFAPA de Cabra (Córdoba) en las variedades Gordal, Picudo y Hojiblanca. Se realizaron observaciones de campo y muestreos de aceitunas para su análisis en laboratorio, así como capturas de adultos de *B. oleae* mediante trampas alimenticias. Los resultados indican que los tres agentes se desarrollan y evolucionan de forma paralela en condiciones de campo. El mosquito se mostró atraído por la herida de puesta (picada) de la mosca en el fruto, independientemente de que ésta hubiera depositado o no huevo en su interior, y la totalidad de las aceitunas que presentaban mosquito en el interior de la picadura mostraban síntomas de Escudete, siendo la herida imprescindible para el desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, se efectuaron en campo dos tipos de picadas artificiales en aceitunas de la variedad Gordal, picada simulando la de la mosca (PSM) y picada sin forma particular o picada irregular (PIR). A las 48 de después de la picada, el 48% de la aceitunas con picada PSM tenían el mosquito mientras que en las PIR no aparecía ningún individuo. Esto indica que el huevo de la mosca no es un requerimiento para el desarrollo del mosquito pero que prefiere la picada de la mosca para realizar su puesta. Por otra parte, cuando las aceitunas fueron introducidas en cámara húmeda, el hongo *B. dothidea* sólo aparecía en las aceitunas que tenían el mosquito, lo que señala una estrecha relación entre estos dos organismos.

Asimismo, el mosquito pudo completar todo el desarrollo desde huevo a adulto en condiciones controladas y alimentándose sobre cultivos puros del hongo *B. dothidea*. Por otra parte, aunque no se aisló el hongo de los estados inmaduros, sí fue aislado del interior de la hembra adulta del mosquito; además se comprobó que ésta posee una mycangia en los últimos segmentos abdominales junto al oviscapto donde porta conidios del hongo, lo que sugiere una asociación mutualista entre *B. dothidea* y *P. berlesiana*.

Con respecto a la interacción entre la Verticilosis con el barrenillo del olivo, en base a la naturaleza vascular de las infecciones de *V. dahliae* en el olivo y al ciclo de vida de *P. scarabaeoides*, se ha planteado evaluar la posible transmisión del patógeno por el escolítido al trasladarse de un árbol enfermo de Verticilosis a otro sano.

Para ello, en primer lugar se realizaron aislamientos en medio de cultivo y mediante técnicas moleculares de PCR para la detección del hongo *V. dahliae* en adultos de barrenillo *P. scarabaeoides* emergidos de ramas de olivos con síntomas de Verticilosis recogidas en varias localidades. En segundo lugar, se evaluó la posibilidad de transmisión del patógeno en condiciones semi-controladas de umbráculo, donde se realizaron dos experimentos, en los cuales grupos de plantas de olivo (2,5 años), libres de *V. dahliae* fueron cubiertos con mosquitera y expuestos a adultos de *P. scarabaeoides* de tres formas diferentes: 1) Ramas o troncos recogidos de varios olivares de árboles gravemente afectados por la Verticilosis y con orificios de entrada (galerías reproducción) de *P. scarabaeoides*, 2) Adultos del barrenillo de olivo extraídos de ramas e inoculados superficialmente con el hongo *V. dahliae*, 3) Plantas con galerías de alimentación que fueron inoculadas por inyección con una concentración elevada del hongo para garantizar su infección. De las tres procedencias se ha constatado un movimiento activo de los adultos a los brotes de olivos sanos, puesto de manifiesto por la abundancia de los orificios de entrada causados por el escolítido. A pesar de ello, las plantas sanas no mostraron síntomas de la enfermedad y no se detectó, en ningún caso, la presencia del hongo en los adultos del barrenillo, ni externa ni internamente, tanto con los procedimientos de aislamiento en medio de cultivo como con las técnicas moleculares de PCR. Por tanto, se concluye que bajo las condiciones experimentales empleadas, no se han encontrado evidencias de que *P. scarabaeoides* pueda ser un vector del hongo *V. dahliae* en olivo.

Summary

Pest and diseases are major constraints for olive cultivation. Between them, the olive fly, *Bactrocera oleae*, and *Verticillium dahliae*, a soil-borne pathogen causing Verticillium wilt of olive, are the agents that cause the most severe economic losses in this crop throughout main olive producer countries in the Mediterranean Basin.

The objectives of the present research work were: 1) To investigate the interaction between the three agents involved in the development of the Dalmatian disease of olive fruits (the fungus *Botryosphaeria dothidea*, the olive fly *B. oleae*, and the cecydomic *Prolasioptera berlesiana*, and 2) To assess the possible role of the olive bark beetle, *Phloeotribus scarabaeoides*, as a vector for transmission of *V. dahliae*, the causal agent of the Verticillium wilt of olive.

For investigating the first point related to the Dalmatian disease, studies were conducted during the years 2009 to 2011 in olive orchards planted with the olive varieties Gordal, Picudo and Hojiblanca, located in the research center of IFAPA, Cabra (Córdoba). Field surveys were carried out for sampling fruits for laboratory analysis. Moreover the population of adults of *B. oleae* was monitored using traps baited with food attractants. Results indicated that the three agents developed and evolved in parallel under field conditions. Thus, the mosquito was attracted by the oviposition punctures caused in fruits by the olive fruit fly, regardless of whether or not the punctures had egg. All the investigated olive fruits in which the mosquito was found inside the punctures provoked by the olive fruit fly exhibited typical symptoms of the Dalmatian disease, being the puncture necessary for the development of the disease.

On the other hand, two types of artificial puncture (one simulating the fly puncture, PSM, and the second simulating an irregular puncture or a wound without any particular form, PIR) were done in the field in fruits of trees of the variety Gordal. At 48h after puncture, the 48% of the olive fruits with PSM puncture had a mosquito inside, whereas in punctures of fruits injured by PIR did not appear any individual. This indicates that the olive fly egg is not required for the development of the mosquito, but prefers the puncture of *B. oleae*. Moreover, when the olive fruits were introduced in a wet chamber, the fungus *B.*

dothidea only appeared in those fruits that had the mosquito, hence is indicated a close relationship between these two agents. Also, the mosquito could complete the entire development from egg to adult under controlled conditions and fed on pure cultures of the fungus *B. dothidea*. Moreover, although the pathogen was not present in the immature, it could be isolated from the inner tissues of adult female mosquitoes. Also it was observed that adult female mosquitoes had a mycangia in the last abdominal segments close to the ovipositor, where the insect is able to carry conidia of the fungus, which is suggesting a mutualistic association between *B. dothidea* and *P. berlesiana*.

Regarding the second objective of this study, Verticillium wilt of olive, caused by *Verticillium dahliae* Kleb., is one of the most important diseases affecting olive crops in the Mediterranean area. The vascular nature of infections of this pathogen in olive and the life cycle of *P. scarabaeoides*, the olive bark beetle, could suggest an interaction between the two organisms related to the spread of *V. dahliae* inoculum from Verticillium wilt affected olive trees to healthy trees. Thus, several experiments, with the aim to evaluate the role of *Phloeotribus scarabaeoides* (olive bark beetle) as a dispersal vector of *V. dahliae* were conducted in semi-controlled conditions from May 2009 to April 2012. Groups of olive trees (2.5-year-old) certified free from *V. dahliae*, were covered by a mosquito net and exposed to adults of *P. scarabaeoides* by two different ways: 1) branches or trunks collected in several olive orchards from trees severely affected by Verticillium wilt and showing apparent entry holes (mating galleries) of *P. scarabaeoides*; 2) adults of olive bark beetle extracted from damaged branches collected in the field or superficially inoculated with *V. dahliae*. The fungus *V. dahliae* was not detected either by microbiological and molecular techniques from shoots where the insects had made galleries of any of the invaded olive trees, or from any of the tissues of the collected beetle adults from the galleries. In none of cases, Verticillium wilt disease symptoms were observed in healthy olive trees exposed to the olive bark beetles. Moreover, the pathogen was never detected from any of beetle adults that were recovered from the mating galleries of branches or trunks collected in several olive orchards from trees severely affected by Verticillium wilt. We can conclude that *P. scarabaeoides* is not a vector of *V. dahliae* in the investigated experimental conditions.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. Los insectos como vectores de enfermedades de plantas.	5
1.1. Enfermedades transmitidas por insectos.....	7
1.1.1. Transmisión de enfermedades víricas.	7
1.1.2. Transmisión de enfermedades bacterianas.	8
1.1.3. Transmisión de enfermedades fúngicas.....	8
1.2. Asociación entre insectos y hongos fitopatógenos.....	9
1.2.1. Interacción de escolítidos y hongos fitopatógenos.	11
1.2.2. Interacción cecidómidos y hongos fitopatógenos.....	14
2. Principales plagas y enfermedades del olivo.....	17
2.1. Mosca del olivo (<i>Bactrocera oleae</i> Gmelin).	19
2.1.1. Descripción morfológica.	19
2.1.2. Ciclo biológico.....	21
2.1.3. Factores que influyen en el desarrollo de las poblaciones de <i>Bactrocera oleae</i>	22
2.1.4. Daños ocasionados e importancia económica.	24
2.1.5. Estrategias y métodos de control de la mosca del olivo.....	25
Control integrado de <i>Bactrocera oleae</i>	25
Medidas basadas en las prácticas agronómicas.....	26
Medidas biológicas.	27
Métodos biotécnicos.	28
Medidas químicas.....	29
Tratamientos adulticida.....	29
Tratamiento larvicida.	29
2.2. Barrenillo del olivo (<i>Phloeotribus scarabaeoides</i> Bernard).....	30
2.2.1. Descripción morfológica.	30
2.2.2. Ciclo biológico.....	31
2.2.3. Daños.	32
2.2.4. Estrategias y métodos de lucha.	32
2.3. Verticilosis del olivo (<i>Verticillium dahliae</i> Kleb).	33
2.3.1. Historia, distribución geográfica e importancia económica.	33
2.3.2. Síntomas y diagnóstico.....	35
2.3.3. Etiología y gama de huéspedes.	36
2.3.4. Ciclo de patogénesis.....	38
2.3.5. Epidemiología: factores influyen en el desarrollo de la Verticilosis del olivo.....	40
2.3.5.1. Factores que favorecen la persistencia, la dispersión y el aumento de los propágulos infectivos (microesclerocios) de <i>Verticillium dahliae</i>	41
2.3.5.2. Factores que favorecen la incidencia, el progreso y la severidad de la enfermedad.	44
Factores agronómicos: riego, fertilización, densidad de árboles y manejo del suelo.	44
Factores ambientales: temperatura, humedad, características edáficas y interacciones bióticas.....	46
2.3.6. Medidas de lucha.	47
Exclusión.	48
Erradicación.	49
Escape.....	51
Uso de variedades resistentes.	51
Terapia.	54
2.4. Escudete de la aceituna (<i>Botryosphaeria dothidea</i> Moug.).....	55
2.4.1. Historia, distribución geográfica e importancia económica.	55
2.4.2. Sintomatología.	55
2.4.3. Agente causal: taxonomía, características generales.....	55

2.4.4. Medidas de lucha.....	56
2.4.5. Factores que influyen en el desarrollo del Escudete.....	57
2.5. El mosquito de la aceituna (<i>Prolasioptera berlesiana</i> Paoli).	58
2.5.1. Ciclo biológico.....	59
2.5.2. <i>Prolasioptera berlesiana</i> , ¿insecto útil o perjudicial?.....	60
CAPÍTULO I. INTERACCIÓN MOSCA DEL OLIVO <i>Bactrocera oleae</i> – CECIDÓMIDO <i>Prolasioptera berlesiana</i> – ESCUDETE (<i>Botryosphaeria dothidea</i>).	
INTRODUCCIÓN.....	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
1. Período y ubicación del estudio.....	66
2. Recogida de muestras de aceitunas.....	67
2.1. Periodo de muestreo.....	67
Primera campaña 2009.	67
Segunda campaña 2010.....	68
Tercera campaña 2011.....	68
2.2. Evaluación en laboratorio.....	69
2.3. Detección del patógeno <i>Botryosphaeria dothidea</i> en aceitunas.	71
2.3.1. Aislamientos en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA).	71
2.3.2. Inducción de estructuras del patógeno mediante cámaras húmedas.....	71
3. Observaciones de aceitunas en campo.....	74
4. Incidencia de las poblaciones naturales de los adultos de <i>Bactrocera oleae</i>	74
5. Detección de <i>Botryosphaeria dothidea</i> en insectos.....	75
5.1. Obtención de los insectos.	75
5.1.1. Adultos y estados inmaduros de <i>Bactrocera oleae</i>	75
5.1.2. Adultos y estados inmaduros de <i>Prolasioptera berlesiana</i>	76
5.2. Detección del <i>Botryosphaeria dothidea</i> mediante métodos microbiológicos.	77
5.3. Observaciones microscópicas de las hembras de <i>Prolasioptera berlesiana</i>	78
6. Presencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> y <i>Botryosphaeria dothidea</i> en picadas artificiales..	79
6.1. Picada artificial simulando la picada de mosca (PSM).....	79
6.2. Picada artificial irregular (PIR).....	80
7. Comprobación del desarrollo del Escudete en picadas artificiales recién efectuadas.....	81
8. Desarrollo del <i>Prolasioptera berlesiana</i> bajo condiciones controladas.	82
9. Comportamiento alimenticio de las larvas del cecidómido <i>Prolasioptera berlesiana</i>	83
10. Análisis estadístico de los datos.....	85
RESULTADOS.....	86
1. Incidencia de los agentes implicados.....	86
1.1. Mosca del olivo (<i>Bactrocera oleae</i>).....	86
1.1.1. Incidencia de las poblaciones naturales de adultos.	86
1.1.2. Incidencia de daños (aceitunas picadas).....	87
1.2. Cecidómido (<i>Prolasioptera berlesiana</i>).....	90
1.3. Escudete (<i>Botryosphaeria dothidea</i>).....	93
2. Interacción mosca del olivo (<i>Bactrocera oleae</i>) - cecidómido (<i>Prolasioptera berlesiana</i>)....	96
2.1. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picada natural de <i>Bactrocera oleae</i>	96
2.2. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picada de mosca viva y no viva.....	102
2.3. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas artificiales simulando la picada de mosca (PSM).	105
2.4. Efecto del tipo de picada artificial sobre la incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i>	110
2.5. Desarrollo del <i>Prolasioptera berlesiana</i> bajo condiciones controladas.	112
3. Interacción mosca del olivo (<i>Bactrocera oleae</i>) y Escudete (<i>Botryosphaeria dothidea</i>).....	113
3.1. Incidencia del Escudete (<i>Botryosphaeria dothidea</i>) en las picadas de mosca (<i>Bactrocera oleae</i>).	113
3.2. Detección del hongo <i>Botryosphaeria dothidea</i> en <i>Bactrocera oleae</i>	116
4. Interacción <i>Bactrocera oleae</i> - <i>Prolasioptera berlesiana</i> - <i>Botryosphaeria dothidea</i>	117

4.1. Incidencia del <i>Prolasioptera berlesiana</i> y <i>Botryosphaeria dothidea</i> en aceitunas con picada natural de mosca (<i>Bactrocera oleae</i>).....	117
4.2. Interacción entre <i>Prolasioptera berlesiana</i> y <i>Botryosphaeria dothidea</i> en picada de mosca viva y no viva.....	120
4.3. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> y <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Escudete) en picadas artificiales simulando la picada de mosca (PSM).	122
4.4. Evaluación el efecto de dos tipos de picada artificial sobre la presencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> y el desarrollo de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Escudete).	123
4.5. Comprobación del desarrollo del Escudete en picadas artificiales recién efectuadas...	125
4.6. Detección del patógeno <i>Botryosphaeria dothidea</i> en <i>Prolasioptera berlesiana</i>	126
4.7. Comportamiento alimenticio de las larvas del cecidómido.	128
1. Cría sobre cultivo de <i>Botryosphaeria dothidea</i>	128
2. Cría sobre aceitunas.....	128
DISCUSIÓN.....	129
1. Incidencia de los agentes (Mosca, Mosquito y Escudete).....	129
1.1. Mosca de olivo (<i>Bactrocera oleae</i>).	129
1.2. El mosquito de la aceituna (<i>Prolasioptera berlesiana</i>)	130
1.3. El Escudete causado por <i>Botryosphaeria dothidea</i>	131
2. Interacción <i>Bactrocera oleae</i> - <i>Prolasioptera berlesiana</i>	132
2.1. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picada natural de <i>Bactrocera oleae</i>	132
2.2. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas artificiales simulando la picada de mosca (PSM).	133
3. Interacción <i>Bactrocera oleae</i> y <i>Botryosphaeria dothidea</i>	135
4. Interacción <i>Bactrocera oleae</i> - <i>Prolasioptera berlesiana</i> - <i>Botryosphaeria dothidea</i>	136
4.1. Incidencia del <i>Prolasioptera berlesiana</i> y <i>Botryosphaeria dothidea</i> en aceitunas con picada natural de mosca (<i>Bactrocera oleae</i>).....	136
4.2. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> y <i>Botryosphaeria dothidea</i> en picadas artificiales simulando la picada de mosca (PSM).	137
CAPÍTULO II. INFLUENCIA DEL BARRENILLO DEL OLIVO <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> (Bern.) (Coleoptera, Scolytidae) EN LA DISPERSIÓN DE VERTICILLOSIS CAUSADA POR <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	
INTRODUCCIÓN.....	142
MATERIALES Y MÉTODOS.....	145
1. Experimento en condiciones de campo (Experimento I).	145
1.1. Muestreo de material vegetal afectado.....	145
1.2. Detección del patógeno <i>Verticillium dahliae</i> en el material vegetal.....	146
1.3. Recogida de adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> del material vegetal y detección del patógeno en sus tejidos.....	148
2. Experimento en umbráculo 2009-2010 (Experimento II).	151
2.1. Material vegetal.	151
2.2. Diseño experimental y tratamientos.	152
2.2.1. Tratamiento 1.	152
2.2.2. Tratamiento 2.	152
2.2.3. Tratamientos control.....	154
2.2.4. Evaluación de los daños, de la enfermedad y de las infecciones.....	154
3. Experimento en umbráculo 2010-2012 (Experimento III).	156
3.1. Diseño experimental y tratamientos.	156
3.1.1. Tratamiento 3.	156
3.1.2. Tratamiento 4.....	159
3.1.3. Tratamiento 5.	160
3.1.4. Tratamiento control.	161
3.1.5. Evaluación de los daños, de la enfermedad y de las infecciones.....	161
4. Análisis estadístico de los datos.....	162
RESULTADOS.....	163

1. Presencia de <i>Verticillium dahliae</i> en ramas de olivo o en adultos de barrenillo (<i>Phloeotribus scarabaeoides</i>) recogidos de árboles que mostraban síntomas de la enfermedad y galerías de puesta en el campo, en el Experimento I.	163
2. Inoculación de árboles de olivo mediante adultos del barrenillo del olivo en el Experimento II.....	163
3. Inoculación árboles de olivo mediante adultos del barrenillo del olivo en el Experimento III.	165
DISCUSIÓN.....	169
CONCLUSIONES.....	173
BIBLIOGRAFÍA.....	176
ANEJO.....	213

TABLAS

Tabla 1. Datos identificativos e informativos de las parcelas donde se llevó a cabo el estudio.	67
Tabla 2. Muestreos de aceitunas recogidas durante la campaña 2009.....	67
Tabla 3. Muestreos de aceitunas recogidas durante la campaña 2010.....	68
Tabla 4. Muestreos de aceitunas recogidas durante la campaña 2011.....	69
Tabla 5. Datos meteorológicos (Temperatura y Humedad Relativa) registrados durante el periodo de las observaciones (Campaña 2010) en la zona del estudio. ..	75
Tabla 6. Incidencia de la picada de <i>Bactrocera oleae</i> en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010. ..	87
Tabla 7. Presencia de la picada de <i>Bactrocera oleae</i> en muestras de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante la campaña 2010 y observadas en el laboratorio.	89
Tabla 8. Incidencia de la picada de <i>Bactrocera oleae</i> en una muestra de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante la campaña 2011 y observadas en el laboratorio.	90
Tabla 9. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010. ..	91
Tabla 10. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en muestras de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante las campañas 2010 y 2011 y observadas en el laboratorio.	93
Tabla 11. Incidencia del Escudete (<i>Botryosphaeria dothidea</i>) en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010.	94
Tabla 12. Incidencia del Escudete (<i>Botryosphaeria dothidea</i>) en muestras de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante la campaña 2010 y observadas en el laboratorio.	96
Tabla 13. Presencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo con picadas de mosca observadas en el campo durante la campaña 2010.	98
Tabla 14. Presencia del <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas de mosca en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante la campaña 2009 y observadas en el laboratorio.	101
Tabla 15. Presencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas de mosca de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante las campañas 2010 y 2011 y observadas en el laboratorio.	102
Tabla 16. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picada viva y no viva de <i>Bactrocera oleae</i> en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante las campañas 2009, 2010 y 2011 y observadas en el laboratorio.....	103
Tabla 17. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas naturales de <i>Bactrocera oleae</i> y artificiales simulando la picada de mosca (PSM) en aceitunas de la variedad Gordal, observadas en el campo durante la campaña 2010.	106
Tabla 18. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas naturales de <i>Bactrocera oleae</i> y artificiales simulando la picada de mosca (PSM) en aceitunas de la variedad Hojiblanca, observadas en el campo durante la campaña 2010.....	107
Tabla 19. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas naturales de <i>Bactrocera oleae</i> y artificiales simulando la picada de mosca (PSM) en aceitunas de la variedad Picudo, observadas en el campo durante la campaña 2010.	108

Tabla 20. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en dos tipos de picada artificial en aceitunas de la variedad Gordal a las 48 horas después de realizar las picadas artificiales.....	110
Tabla 21. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas artificiales irregulares (PIR) durante recogidas periódicas de aceitunas de la variedad Gordal.....	111
Tabla 22. Puestas de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas artificiales PSM realizadas en aceitunas de la variedad Gordal tras 24 y 48 horas.....	111
Tabla 23. Duración promedio en días de las diferentes fases de desarrollo y total del ciclo de vida del cecidómido <i>Prolasioptera berlesiana</i> en condiciones de insectario.....	112
Tabla 24. Incidencia de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Escudete) en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo con picada de mosca en ausencia del cecidómido, observadas en campo durante la campaña 2010.	114
Tabla 25. Incidencia de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Escudete) en aceitunas con picadas de mosca sin cecidómido y en aceitunas sin picada en muestras recogidas durante la campaña 2010.	115
Tabla 26. Frecuencia de aislamiento de <i>Botryosphaeria dothidea</i> en adultos (hembras) de <i>Bactrocera oleae</i>	116
Tabla 27. Incidencia del Escudete en aceitunas picadas de <i>Bactrocera oleae</i> en función de la incidencia del cecidómido <i>Prolasioptera berlesiana</i> en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo, observadas en campo y recogidas durante las campañas 2009, 2010 y 2011.	118
Tabla 28. Incidencia del cecidómido y Escudete en función del tipo de picada de mosca viva y no viva, en muestreos de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el laboratorio recogidas durante las campañas 2009, 2010 y 2011.	121
Tabla 29. Incidencia del Escudete en función de la presencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picadas artificiales (simulando la picada de mosca PSM) en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en campo durante la campaña 2010.	122
Tabla 30. Comparación entre la incidencia del Escudete y el cecidómido en picadas naturales de <i>Bactrocera oleae</i> y artificiales (PSM), en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en campo durante la campaña 2010.	123
Tabla 31. Incidencia del cecidómido y <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Escudete) en dos tipos de picada artificial en aceitunas de la variedad Gordal a las 48 horas después de realizar las picadas artificiales.	124
Tabla 32. Interacción cecidómido y <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Escudete) en función del tiempo transcurrido desde la picada de mosca y picadas irregulares (PIR).....	125
Tabla 33. Frecuencia de aislamiento de <i>Botryosphaeria dothidea</i> de aceitunas de la variedad Gordal con dos tipos de picadas artificiales y recogidas a 48 horas en función de la presencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i>	126
Tabla 34. Muestreos de ramas de olivo recogidas en campo y utilizadas en los experimentos.....	146
Tabla 35. Número de galerías de alimentación por árbol producidas por adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> en árboles sanos de olivo en el Experimento II desde Mayo a Junio de 2009 ^a	164
Tabla 36. Número de galerías de alimentación por rama producidas por adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> en árboles sanos de olivo en el Experimento II desde Septiembre de 2009 a Marzo de 2010 ^a	165

Tabla 37. Número de galerías de alimentación y puesta producidas por adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> en árboles sanos de olivo en el Experimento III desde Octubre de 2010 a Junio de 2011 ^a	167
Tabla 38. Número de galerías de alimentación y de puesta por rama producidas por <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> en árboles sanos de olivo en el Experimento III desde Noviembre de 2011 a Marzo de 2012 ^a	168

FIGURAS

Figura 1 . Mosca del olivo <i>Bactrocera oleae</i> , Adulto [Hembra (A) y Macho (B)], Huevo (C), Larva (D) y Pupa (E).	20
Figura 2. Adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> [Hembra (A) y Macho (B)], foto tomada por el autor de la tesis.	30
Figura 3. Galerías de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> [Reproducción (A) y Alimentación (B)].	32
Figura 4. Síntomas de Verticilosis en el olivo [Apoplejía (A), necrosis de la inflorescencia (B), defoliación intensa de hojas verdes de los brotes y ramas (C) y coloración vascular (D)].	36
Figura 5. Ciclo de patogénesis de <i>Verticillium dahliae</i> en huéspedes leñosos (adaptado de Hiemstra y Harris, 1998).	39
Figura 6. Aparato genital de <i>Prolasioptera berlesiana</i> : Hembra (Ovipositor) (A) y Macho (B), foto tomada por el autor de la Tesis.	59
Figura 7. Vista aérea de las parcelas objeto del estudio. Fuente: Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC).	66
Figura 8. Picadas de <i>Bactrocera oleae</i> [sin síntomas de Escudete (A), con síntomas de Escudete (B)].	68
Figura 9. Estados preimaginales de <i>Bactrocera oleae</i> [Huevo (A), Larva (B) y Pupa (C)], Galería abandonada de la mosca (D).	70
Figura 10. Estados preimaginales de <i>Prolasioptera berlesiana</i> [Huevo (A), Larva (B) y Pupa (C)].	70
Figura 11. Aislamientos del hongo <i>Botryosphaeria dothidea</i> de aceitunas en medio de cultivo PDA.	71
Figura 12. Preparación de cámaras húmedas (A, B, C). Aceitunas infectadas por el hongo <i>Botryosphaeria dothidea</i> en cámara húmeda (D). Crecimiento del hongo <i>Botryosphaeria dothidea</i> en PDA (E). Microscopio Óptico (Nikon eclipse 90i) (F). Conidios de <i>Botryosphaeria dothidea</i> [tipo redondeado, ovoides-piriformes, frecuentemente oscuros y septados (G) y tipo alargado: fusiformes, hialinos y mayoritariamente aseptados (H)].	73
Figura 13. Captura de adultos de mosca del olivo mediante trampas alimenticias (Polillero de Econex).	74
Figura 14. Captura de adultos de mosca del olivo mediante trampas de feromonas (EOSTRAP® INVAGINADA).	76
Figura 15. Obtención de adultos (hembras) de <i>Prolasioptera berlesiana</i> bajo las condiciones del insectario.	77
Figura 16. Aislamientos del hongo <i>Botryosphaeria dothidea</i> de hembras de <i>Bactrocera oleae</i> en medio de cultivo PDA.	78
Figura 17. Observaciones microscópicas en las hembras de <i>Prolasioptera berlesiana</i> para comprobar la presencia de <i>Botryosphaeria dothidea</i>	79
Figura 18. Realización de picadas artificiales (simulando la picada de <i>Bactrocera oleae</i>) en aceitunas.	80
Figura 19. Aceitunas con picadas artificiales [Picada simulando la picada de mosca (PSM) (B) y Picada irregular (PIR) (B)].	81
Figura 20. Aceituna con picada irregular con síntomas de Escudete (A). Picada irregular con larva del cecidómido (B).	81
Figura 21. Picada artificial (PSM) (A). Picada artificial (PSM) con huevo de <i>Prolasioptera berlesiana</i> (B). Aceitunas con huevos de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en cajas cilíndricas de plástico transparente (C).	83

Figura 22. Placa petri con cultivo activo de <i>Botryosphaeria dothidea</i> y larvas del cecidómido (A). Larva del cecidómido sobre el micelio de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B). Adulto del cecidómido emergido en la placa petri sobre el micelio de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (C).	84
Figura 23. Larva de <i>Prolasioptera berlesiana</i> colocada en picada artificial simulando la picada de mosca del olivo (A y B). Aceitunas con huevos y larvas del cecidómido en cajas de plástico transparente (C).	85
Figura 24. Captura de adultos de <i>Bactrocera oleae</i> en trampas alimenticias, en las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo durante la campaña 2010.	86
Figura 25. Porcentaje de aceitunas picadas por <i>Bactrocera oleae</i> en las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo, observaciones de campo durante la campaña 2010.	88
Figura 26. Porcentaje de la incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010.	92
Figura 27. Porcentaje de incidencia del Escudete (<i>Botryosphaeria dothidea</i>) en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010.	95
Figura 28. Huevo de la mosca del olivo (A) junto a un huevo del cecidómido (B) en el interior de la picada. Larvas de <i>Prolasioptera berlesiana</i> junto a una pupa de <i>Bactrocera oleae</i> en el interior de la galería (C).	97
Figura 29. Datos meteorológicos (Temperatura y Humedad Relativa) registrados durante el periodo de las observaciones en la zona del estudio (A). Relación entre la captura de adultos (Hembras) (B), picada de <i>Bactrocera oleae</i> y la presencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en aceitunas de las variedades Gordal (C), Hojiblanca (D) y Picudo (E) observadas en el campo durante la campaña 2010.	100
Figura 30. Incidencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en picada viva y no viva de <i>Bactrocera oleae</i> , en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante las campañas 2009 (A), 2010 (B) y 2011 (C).	104
Figura 31. Datos meteorológicos (temperatura y humedad relativa) registrados durante el periodo de los ensayos (A). Relación entre dos tipos de picadas (natural de <i>Bactrocera oleae</i> y artificial simulando la picada de mosca) y la presencia de <i>Prolasioptera berlesiana</i> en aceitunas de las variedades Gordal (B), Hojiblanca (C) y Picudo (D), observadas en el campo durante la campaña 2010. Fechas de los ensayos: 27 de Julio (A) y 30 de Agosto (B).	109
Figura 32. Fases de desarrollo del cecidómido <i>Prolasioptera berlesiana</i> . Huevo (A), Estados larvarios (B), Pupa (C), Adulto (D).	113
Figura 33. Efecto de la picada de <i>Bactrocera oleae</i> (en ausencia del cecidómido) en la incidencia de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Escudete) en aceitunas de la variedad Gordal observadas en el campo durante la campaña 2010.	115
Figura 34. Relación entre la incidencia de picada de <i>Bactrocera oleae</i> , del cecidómido <i>Prolasioptera berlesiana</i> y de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Escudete), en aceitunas de las variedades Gordal (B), Hojiblanca (C) y Picudo (D), observadas en campo durante la campaña 2010.	119
Figura 35. Abdomen de una hembra de <i>Prolasioptera berlesiana</i> (A). Conidios de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B y C). * Bolsa (mycangia) con conidios de <i>Botryosphaeria dothidea</i>	127
Figura 36. Recogida de ramas de olivo de árboles atacados por <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> y/o con síntomas de Verticilosis.	146

Figura 37. Aislamiento de <i>Verticillium dahliae</i> de las ramas de poda recogidas de plantaciones de olivo atacadas por <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> y con aparentes síntomas de Verticilosis.	147
Figura 38. Obtención de Adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> a partir de ramas recogidas de campo.	148
Figura 39. Aislamiento de <i>Verticillium dahliae</i> a partir de adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> procedentes de ramas de poda.	150
Figura 40. Árboles del olivo empleadas en los experimentos.	151
Figura 41. Tratamiento 1: Grupos de árboles de olivo libres de infecciones por <i>Verticillium dahliae</i> fueron cubiertos individualmente por una tela mosquitera de fibra de carbono (A) y expuestos a ramas de poda infestadas por la Verticilosis y con orificios de entrada de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> (B).	152
Figura 42. Inoculación de adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> con el hongo <i>Verticillium dahliae</i> (A, B y C). Tratamiento 2: Grupos de árboles de olivo libres de infecciones por <i>Verticillium dahliae</i> fueron cubiertos individualmente por una tela mosquitera de fibra de carbono y expuestos a adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> previamente inoculados con <i>Verticillium dahliae</i> (D).	153
Figura 43. Control 1: Grupo de dos árboles de olivo libres de infecciones por <i>Verticillium dahliae</i> fueron cubiertos por una tela mosquitera y expuestos a ramas de poda con orificios de entrada de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> y libres de Verticilosis (A). Control 2. Grupo de dos árboles de olivo libres de <i>Verticillium dahliae</i> sin cubrir y no expuestos a adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> o a ramas afectadas por éste y libres de Verticilosis (B).	154
Figura 44. Material vegetal muestreado mensualmente en el experimento II para comprobar si los adultos de barrenillo extraídos de su interior se hallaban infestados interna o externamente por <i>Verticillium dahliae</i>	156
Figura 45. Tratamiento 3. Un grupo de 20 árboles de olivo procedentes del experimento II fueron inoculados con <i>Verticillium dahliae</i> por inyección al tronco, y introducidos en una tela de mosquitera (A, B y C). Cuatro semanas más tarde se introdujeron en las tiendas ramas de olivo infestadas por <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> (D). En el otoño los árboles fueron de nuevo inoculados por inyección al tronco y se introdujeron dentro de la red seis nuevas plantas de olivo sanas (E).	158
Figura 46. Tratamiento 4: Un grupo de 20 árboles de olivo procedentes del experimento II se introdujeron en una tela mosquitera y fueron expuestos a adultos vivos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> inoculados artificialmente con <i>Verticillium dahliae</i> (A). En el otoño se introdujeron en la red cuatro nuevos árboles sanos de olivo (B).	160
Figura 47. Tratamiento 5: Grupo de 8 árboles de olivo libres de Verticilosis se introdujeron en una tela mosquitera y fueron expuestos a ramas de poda infestados por la Verticilosis y con orificios de entrada de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i>	160
Figura 48. Control. Grupo de 4 árboles de olivo libres de <i>Verticillium dahliae</i> sin cubrir y no expuestos a adultos de <i>Phloeotribus scarabaeoides</i> o a ramas afectadas por éste.	161

Introducción general y objetivos

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

El olivo tiene una importancia significativa en la economía de muchos países cultivadores de la Cuenca Mediterránea, donde se encuentra el 98% de la superficie mundial de olivar. España es el líder mundial tanto en superficie cultivada como en producción. En el contexto español, Andalucía es la zona con mayor producción cubriendo gran parte del mercado nacional y en parte el mercado internacional.

En España, como en la mayoría de los países mediterráneos, el agroecosistema del olivar se ve afectado por múltiples factores que interaccionan en su desarrollo y producción, entre los que destacan las plagas y enfermedades. Sin lugar a duda, la mosca del olivo *Bactrocera oleae* y la Verticilosis del olivo, causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb, constituyen las principales preocupaciones fitosanitarias de la mayoría de los olivicultores, debido a las pérdidas económicas que ocasionan en los olivares tanto en España como en toda la Cuenca Mediterránea. Otras plagas y enfermedades que afectan al cultivo del olivo son consideradas secundarias, menos perniciosas, pero en determinadas áreas o condiciones pueden llegar a causar graves daños; tales casos son, entre otros, el barrenillo del olivo *Phloeotribus scarabaeoides* y el Escudete causado por el hongo *Botryosphaeria dothidea*.

Un aspecto de la epidemiología de las enfermedades del olivo no considerado hasta ahora es la posible transmisión de los patógenos por diversos insectos. Esto parece particularmente importante en el caso de la Verticilosis y de las podredumbres de frutos debidas a *B. dothidea*.

El desarrollo del Escudete desde primavera a otoño, en condiciones climatológicas de humedad relativa baja y temperaturas altas y asociado a la presencia de heridas en las aceitunas, hace pensar en la posible implicación de agentes bióticos como vectores del patógeno. Así, se ha intentado demostrar una correlación entre los ataques de la mosca del olivo (*B. oleae*), la incidencia del mosquito de aceituna (*Prolasioptera berlesiana*) y el desarrollo de la enfermedad del Escudete (*B. dothidea*). En la bibliografía científica existe amplia divergencia de opiniones sobre la interacción de los tres agentes implicados. Algunos señalan a *P. berlesiana* como posible vector de *B. dothidea*, pero la forma en la que participa en la dispersión del patógeno, así como la importancia que se le da como vector o como

depredador de huevos de *B. oleae* son diferentes según sea el autor (Fraval, 1977; Arambourg 1986; De Andrés-Cantero, 2001; Sasso y Viggiani, 2007).

A pesar del esfuerzo realizado por los investigadores para desentrañar las interacciones de *B. dothidea* con *B. oleae* y *P. berlesiana* (Verona, 1952; Harpaz y Gerson, 1966; La Greca y Vrenna, 1995; González *et al.*, 2006), la naturaleza de las mismas no es bien conocida, aunque es determinante de las epidemias de Escudete. Por lo tanto, es de interés aclarar estas interacciones para adoptar medidas adecuadas de control de la enfermedad.

Por otro lado, aunque no se ha publicado ninguna prueba científica que apunte a una posible transmisión por insectos de la Verticilosis, la naturaleza vascular de las infecciones de *V. dahliae* en el olivo y el ciclo de vida de *P. scarabaeoides* podría permitir una interacción entre los dos organismos que resultara en el transporte de conidios infectivos del patógeno por parte del escolítido al trasladarse de un árbol enfermo de Verticilosis a otro sano. Esta hipótesis se apoya en observaciones de campo en olivares con daños causados por ambos organismos en varias localidades de Andalucía. El presente estudio es, por tanto, el primer intento que pretende indagar en una posible interacción entre la Verticilosis y el barrenillo del olivo.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Estudiar la interacción de los agentes implicados en la aparición del Escudete: *Botryosphaeria dothidea* como agente causal, *Prolasioptera berlesiana* como posible vector y *Bactrocera oleae*, como nexo de unión entre los dos anteriores.

- 1.1. Evaluar la incidencia de cada uno de los agentes en el olivar de la zona de estudio.
- 1.2. Profundizar en el conocimiento de aspectos biológicos del mosquito *P. berlesiana* en relación con.
 - 1.2.1. Su asociación con la mosca *B. oleae*.
 - 1.2.2. Su asociación con el hongo *B. dothidea*.
 - 1.2.3. Su desarrollo y alimentación en condiciones controladas.
- 1.3. Evaluar la posible dispersión de *B. dothidea* por la mosca *B. oleae*.

2. Evaluar la posible interacción de *Phloeotribus scarabaeoides* (barrenillo del olivo) con el hongo *Verticillium dahliae* causante de la Verticilosis del olivo.

- 2.1. Comprobar si el hongo *V. dahliae* puede ser detectado en adultos de barrenillo *P. scarabaeoides* emergidos de ramas en olivos con síntomas de Verticilosis en campo.
- 2.2. Evaluar la capacidad de adultos de *P. scarabaeoides* expuestos a inóculo de *V. dahliae* para transmitir el hongo a árboles sanos de olivo.

Revisión bibliográfica

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Los insectos como vectores de enfermedades de plantas.

Las causas más comunes del crecimiento deficiente de las plantas y de la destrucción de cosechas son los fitopatógenos, el clima desfavorable, las malezas y las plagas de insectos (Agrios, 2005).

Las plagas dañan las plantas en diversas formas. Producen daños directos cuando destruyen sus órganos (raíces, tallos, hojas, yemas, flores, frutos o semillas) en forma parcial o total, o las debilitan reduciendo su capacidad de producción. También provocan daños indirectos que pueden ser de gran importancia, por ejemplo, cuando participan en la propagación de microorganismos que causan enfermedades en las plantas.

Casi toda la dispersión de los fitopatógenos se lleva a cabo pasivamente mediante la participación de agentes de dispersión tales como el aire, el agua, los insectos, otros animales, como algunos nematodos, y el hombre. Algunas especies de insectos y algunos ácaros fitófagos actúan como vectores o agentes transmisores de patógenos que producen enfermedades de las plantas. Los patógenos transmitidos de esta manera son en su mayor parte virus, fitoplasmas y bacterias fastidiosas y, en menor proporción, hongos y bacterias (Carter, 1962; Holmes y Tsai, 1980; Purcell y Almeida, 2005; Almeida *et al.*, 2005).

Muchos insectos actúan como agentes dispersores de patógenos por el mero hecho de posarse en tejidos enfermos y después en plantas sanas, llevando a los agentes patógenos adheridos a sus apéndices. A este proceso se le denomina transmisión mecánica del patógeno y no supone ninguna asociación estrecha (el mutualismo de *Ophiostoma ulmi*, causante de la Grafiosis del olmo es, por ejemplo, una relación estrecha) entre el insecto y el patógeno. En otras enfermedades, los insectos quedan impregnados con varias clases de bacterias o con esporas pegajosas de ciertos hongos cuando visitan a las plantas, transportándolas por vía externa de planta a planta, depositándolas sobre su superficie o en las heridas que ocasionan cuando se alimentan de ellas, como es el caso de las pudriciones blandas bacterianas, las antracnosis y el cornezuelo del centeno (Agrios, 2005).

Por el contrario ciertas enfermedades de plantas, particularmente virus, fitoplasmas y bacterias fastidiosas, requieren de un insecto o ácaro vector como único o principal medio de dispersión. Esta transmisión supone cierto grado de evolución asociada entre el vector y el patógeno, por lo que el proceso se califica como transmisión biológica.

Otros insectos, provocan lesiones en los tejidos vegetales y de esta manera facilitan la entrada de agentes patógenos, preferentemente hongos y bacterias causantes de podredumbres, que de otro modo no podrían afectar a los tejidos. Algunos ejemplos son las perforaciones causadas por el barrenillo de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis*, que favorece la entrada del hongo *Fusarium moniliforme* Sheldon, causante de la podredumbre colorada; o la del hongo *Ceratocystis paradoxa* Seynes, que produce la podredumbre negra o “corazón negro” de la caña (Ayquipa *et al.*, 1979). Asimismo, las heridas hechas por el curculiónido *Pissodes nemorensis* y la polilla *Rhyacionia subtropica* ayudan al establecimiento de *Fusarium circinatum* en *Pinus radiata*, ya que las esporas presentes en el aire infectan las heridas frescas (Gordon *et al.*, 2001). En estos casos los insectos no son verdaderos vectores de la enfermedad, aunque contribuyen a su dispersión e incidencia. Morse y Blanchette (2002) mencionan a *F. solani* como el principal colonizador de heridas frescas en *Acer negundo*, aunque no como el agente causal del manchado rojo, por la incapacidad del hongo para reproducir la lesión. Por el contrario, se atribuyen las áreas localizadas del manchado rojo, generalmente distribuidas alrededor de la herida, al producto de la oxidación de las células del árbol donde se producen fenoles.

En todas las enfermedades en las que el patógeno es transportado interna o externamente por uno o varios vectores específicos, la dispersión del patógeno depende en gran medida o por completo de su(s) vector(es). Sin embargo, en aquellas enfermedades en las que el insecto no es un vector específico, la dispersión del patógeno es facilitada por el vector, aunque no depende de éste.

Los insectos diseminan a los patógenos a distancias variables dependiendo del tipo de insecto, la asociación que se establece entre éste y el patógeno, y las condiciones climatológicas predominantes, en particular el viento.

1.1. Enfermedades transmitidas por insectos.

Las principales epidemias en cultivos de plantas que dependen de la dispersión del patógeno causante por insectos son, por orden de importancia, las enfermedades víricas, las bacterianas y por último las fúngicas.

1.1.1. Transmisión de enfermedades víricas.

La transmisión de virus puede efectuarse por insectos tanto masticadores como picadores-chupadores. Se trata de una transmisión mecánica en que el virus es transportado en las piezas bucales de los insectos y, en algunos casos, en el interior (hemolinfu) de estos. En algunos virus sólo ocurre la transmisión biológica, requiriéndose obligatoriamente la presencia de un vector.

Los principales vectores de virus son los áfidos, y siguen en importancia los cicadélidos, los Trípidos, las moscas blancas, las cochinillas harinosas, las chinches y los ácaros eriófidos.

Los áfidos transmiten un mayor número de virus que cualquier otro grupo de insectos, siendo el pulgón *Myzus persicae* uno de los vectores más eficientes. La mayoría de los virus transmitidos por áfidos, causan mosaicos y son del tipo no persistente, aunque se conocen algunos virus transmitidos por áfidos que son persistentes, como el virus del enrollamiento de la patata.

Los cicadélidos transmiten generalmente virus persistentes, aunque también fitoplasmas o bacterias fastidiosas que no pueden ser transmitidos mecánicamente. Por lo general son virus circulativos y propagativos, algunos de transmisión transovarial. Estos virus producen en las plantas enfermedades conocidas como amarilleces, estriamientos cloróticos, necrosis del floema y tumores.

Algunos insectos masticadores de gran movilidad, como los escarabajos crisomélidos, pueden transmitir una serie de virus, principalmente en forma mecánica, entre los que se

hayan los mosaicos de las cucurbitáceas y del tabaco, el ahusamiento del tubérculo de patata, el virus X de la patata, la mancha anular del tabaco y otros.

1.1.2. Transmisión de enfermedades bacterianas.

Los insectos se comportan como transmisores, diseminadores y reservorios de bacterias fitopatógenas. La relación existente entre los insectos y las bacterias fitopatógenas que transmiten se ha identificado como de tipo simbiótico de diversos grados. Así, se haya desde la más simple, la de ectosimbiosis y/o endosimbiosis, en la cual el patógeno sobrevive sobre el lumen intestinal; hasta la simbiosis más completa, con la formación de estructuras especiales por parte del insecto para almacenar al microorganismo (Ishikawa, 1989; Dillon y Dillon, 2004; Baumann *et al.*, 2006).

En ciertos casos se ha establecido un mutualismo entre el insecto y la bacteria. Un caso de interés principal en esta revisión relacionado con el cultivo de olivo, es el de la estrecha asociación de *Bactrocera (Dacus) oleae* y *Pseudomonas savastanoi* causante de la Tuberculosis del olivo. Esta bacteria patógena se mantiene dentro del insecto de generación en generación, mediante transmisión transovárica o contaminación del huevo (embrión) antes de la oviposición, y también se conoce el desarrollo de estructuras para albergar al patógeno durante la época de metamorfosis y pupación del insecto (Petri, 1910; Hagen, 1966; Poinar, 1975; Mazzini y Vita, 1981; Manousis y Ellar, 1988). No hay evidencias de que la asociación entre la bacteria y el insecto sea obligatoria por parte de alguno de los dos. Además, estudios recientes han identificado varias especies de bacterias en el tracto digestivo de las moscas silvestres de olivo (Kounatidis *et al.*, 2009), siendo la más común y extendida *Candidatus Erwinia dacicola* (Capuzzo *et al.*, 2005; Estes, 2009; Estes *et al.*, 2009).

1.1.3. Transmisión de enfermedades fúngicas.

Sin duda, en una gran cantidad de enfermedades fúngicas de plantas los insectos sirven como vectores de las esporas producidas por hongos, pero esta participación es en muchos casos de muy poca importancia. En cualquier caso, hay algunas enfermedades fúngicas en las que la diseminación del hongo depende determinadamente de los insectos.

Debido a que el tema objeto de estudio de esta tesis doctoral trata de la implicación de insectos en la dispersión de enfermedades fúngicas, en este caso del olivo, en los epígrafes siguientes de este manuscrito se revisará de forma detallada la asociación entre los insectos y hongos, particularmente los grupos de insectos a los cuales pertenecen las especies que afectan a este cultivo.

1.2. Asociación entre insectos y hongos fitopatógenos.

La asociación, particularmente mutualista, entre insectos y microorganismos ha jugado un papel importante en el éxito del proceso evolutivo y ecológico de la Clase Insecta (Janson *et al.*, 2008). La más frecuente está representada por las bacterias en el intestino, pero también la simbiosis insectos-hongos está extendida en varios grupos de insectos (escarabajos, hormigas, mosquitos). En base a registros de fósiles, se sabe que los insectos se han asociado con hongos durante cientos de millones de años (Brock, 1974; Borror *et al.*, 1976). Estas asociaciones han podido ocurrir desde casualmente, hasta de forma simbiótica en función de los beneficios evolutivos del hongo, del insecto, o de ambos.

En esta asociación, el insecto usa al hongo normalmente como fuente de alimentación y a cambio el primero dispersa al segundo o fomenta su autocruzamiento (Heath y Stireman, 2010). Sin embargo, en una asociación insecto-hongo, el hongo puede beneficiarse de otras diversas maneras. El insecto puede trasladar al hongo a una ubicación conveniente; facilitar su entrada en una planta huésped rompiendo la barrera por el daño que produce en el huésped; servir de anfitrión para el hongo, ya sea como un patógeno comensal (beneficiando uno pero no dañando al otro), o una relación mutua/simbiótica. La asociación también puede beneficiar al insecto. Por ejemplo, como se ha dicho antes, el hongo puede servir como alimento al insecto, en tanto que algunos hongos pueden resultar más nutritivos para los insectos que el material vegetal debido a los niveles relativamente altos de proteínas o esteroides de éstos (Southwood, 1973). El hongo también puede realizar modificaciones del material vegetal que beneficien a la alimentación del insecto. Por ejemplo, la degradación del material vegetal que producen las larvas de las avispas de madera (Kukor y Martin, 1983). Otro ejemplo es el de la relación del escarabajo de la savia y los hongos toxigénicos en maíz (Dowd, 1992). En este caso el insecto, al ser portador de un hongo productor de toxina, podría excluir a otros

insectos competidores de la fuente de alimentación, siempre que el insecto vector fuera resistente a la toxina.

También en otros casos se han mencionado insectos como vectores de hongos productores de toxinas en la planta huésped, que podrían generar importantes problemas para la industria alimentaria. Por ejemplo, algunos estudios indican que el barrenillo del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), podría ser un vector de hongos toxigénicos en las plantaciones de café (Vega *et al.*, 1999).

La simbiosis entre insectos y hongos ocurre ampliamente en la naturaleza y sus mecanismos e interacciones han sido de considerable interés ecológico. Por ejemplo, los escarabajos ambrosiales, concretamente los escolítidos, tienen estructuras especializadas llamadas mycangias (en terminología anglosajona) que emplean para llevar a esporas de hongos específicos. Sus larvas se alimentan principalmente de los hongos que son introducidos en la madera desde la mycangia (Beaver, 1989; Kajimura y Hijii, 1992).

De forma similar, las avispas de madera inoculan el hongo *Amylostereum* en la madera con sus huevos. Sus larvas pueden hacer uso de celulosa descompuesta por las enzimas digestivas que son derivados de sus hongos simbioses (Kukor y Martin, 1983). Las hormigas cultivan hongos basidiomycetos como fuente de alimento principal en su nido (jardín de hongos) que realizan en diversos sustratos (Quinlan y Cherrett, 1978; Cherrett *et al.*, 1989; Mueller *et al.*, 2001).

Un último ejemplo se refiere a los mosquitos cecidómidos, sobre todo especies de las tribus Asphondyliini, Lasiopterini y Alycaulini (Roskam (2005), que inducen agallas en su huésped y se caracterizan por la alimentación endomycetófaga de sus larvas (Neger, 1910; Bissett y Borkent, 1988). Las larvas del mosquito de agalla utilizan como fuente de alimento el micelio fúngico que crece en la superficie interior de las agallas (Bissett y Borkent, 1988; Janson *et al.*, 2009).

1.2.1. Interacción de escolítidos y hongos fitopatógenos.

La familia Scolytidae está representada por coleópteros en su mayoría fitófagos, que se encuentran distribuidos por todos los continentes y están asociados a la casi totalidad de las especies vegetales. Éstos ocasionan graves perjuicios a los huéspedes que colonizan debido fundamentalmente a la realización de galerías de puesta que provocan la destrucción o disfunción del xilema y/o floema. Dicho agravio se acentúa al ser vectores de numerosos hongos patógenos que provocan enfermedades en los vegetales que colonizan, así como por los daños ocasionados en las partes verdes del vegetal por aquellas especies primarias que realizan alimentaciones de maduración sexual (Fernández, 1997). En condiciones de bajos niveles poblacionales, los escolítidos mantienen el equilibrio en el ecosistema forestal, participando en la descomposición de la materia orgánica acumulada en el bosque, en la eliminación de los árboles moribundos, así como realizando labores de poda natural. Son además los pioneros en el asentamiento de otros grupos de insectos secundarios del ecosistema forestal. La situación de plaga se desencadena al romperse este equilibrio, generalmente cuando los niveles poblacionales aumentan o bien cuando disminuye la capacidad de defensa del huésped (Fernández, 1997).

Los insectos de la familia Scolytidae son muy poco conocidos, especialmente por su tamaño pequeño (rara vez sobrepasan los 5mm); además, pasan su vida dentro de ramas, troncos, peciolo de hojas, e incluso semillas. Construyen galerías de formas curiosas, tan características que por ellas se puede deducir la identidad de una tribu o género en particular (Gil *et al.*, 2004). Muchas especies de la familia Scolytidae atacan a una sola parte muy particular del huésped (conos o frutos de árboles, ramas delgadas, troncos pequeños, corteza, raíces o troncos recién caídos). Sin embargo, otras son muy agresivas y logran afectar tejidos sanos y vivos. Generalmente, los árboles que crecen en condiciones desfavorables son más susceptibles al ataque de este grupo de barrenillos (Wood, 1992).

En base a los hábitos de alimentación en la familia Scolytidae se conocen especies espermófagas (se alimentan de semillas o de la cubierta más externa que las cubre), mielófagas (se alimentan de la médula de enredaderas), fleófagas (infestan el floema), xylófagas (incluye a aquellas que viven y se alimentan del xilema o tejidos leñosos), o xilomicetófagas (barrenillos de madera que utilizan relaciones simbióticas y cultivo de hongos

del grupo ambrosía). Estos últimos representan el grupo más especializado en cuanto a la selección del huésped, debido a que inicialmente se alimentan de la madera y luego de las esporas del hongo ambrosía que crecen en las galerías hechas por el insecto adulto. Por lo tanto, la relación simbiótica hongo/huésped determina un crecimiento apropiado del hongo dentro de las galerías (Beaver, 1989).

Uno de los casos más estudiados es la enfermedad de la Grafiosis del olmo, o enfermedad del olmo holandés. A principios del siglo pasado ya se conocía la implicación de los escolítidos en el desarrollo de esta enfermedad. Así, gran parte de los primeros trabajos realizados en los Países Bajos entre los años 1920 y 1930 constituyen el fundamento de buena parte de los conocimientos disponibles actualmente sobre esta enfermedad. Los estudios iniciales se enfocaron en los escolítidos *Scolytus scolytus* y *S. multistriatus*, su ciclo de la enfermedad, y la forma en que el comportamiento de los escarabajos vectores podría alterar la probabilidad de transmisión de la enfermedad. Marchal (1927) fue el primero en sugerir la implicación de los escarabajos de la corteza de olmo en la transmisión del enfermedad, y Wollenweber y Stapp (1928) confirmaron esta relación cuando aislaron *Ophiostoma ulmi* de excrementos del escolítido. Tal vez más significativa fue la observación de Betram (1929) al advertir que la actividad alimenticia del escarabajo ocasionaba la transmisión de las enfermedades de árboles sanos a enfermos. Sin embargo, fue la investigación llevada a cabo por Fransen en la década de 1930 la que dilucidó gran parte del ciclo de la enfermedad. Este investigador demostró que el insecto no sólo portaba externamente en el exoesqueleto al patógeno *O. ulmi*, sino también en su intestino. Además, los escarabajos se contaminan con las esporas del patógeno en la cámara pupal antes de la emergencia, y la posición de la cámara pupal en la corteza del olmo puede tener una influencia marcada en la cantidad del inóculo disponible para contaminar los insectos (Fransen, 1931a,b; Fransen y Buisman, 1935; Fransen, 1939).

De las investigaciones de Fransen (1931a,b y 1939) durante la primera epidemia y las subsecuentes investigaciones más recientes, se conoce en la actualidad que las preferencias alimenticias del escarabajo pueden cambiar la probabilidad de que un árbol se infecte (Webber, 2004). Sin embargo, el proceso de transmisión de la enfermedad es muy complejo y depende de varios factores. El comportamiento de cada especie e, incluso, de cada insecto individual, durante el ciclo de la enfermedad durante su alimentación en la corteza y la

diseminación y búsqueda del huésped influyen en la transmisión, en la cantidad y calidad de las esporas del patógeno transportadas. Por ello, este comportamiento afecta al éxito de la transferencia del patógeno desde el vector hasta la mordedura de alimentación y, finalmente, al potencial de colonización del sistema vascular del árbol. Los mecanismos de resistencia de los olmos juegan también un papel en la transmisión de la enfermedad, incluyendo a los mecanismos que operan en la mordedura de alimentación y en el sistema vascular (Webber, 2004).

Según Hulcr *et al.* (2007), a excepción de dos identificaciones de hongos de ambrosía basidiomicetos (Batra, 1972; Hsiau y Harrington, 2003), como *Entomocorticium dendroctoni* (Paine *et al.*, 1997) y algunos otras levaduras (Batra, 1963; Francke-Grosmann, 1967), como *Ambrosiozyma*, todos los hongos ambrosía pertenecen a Ascomycota. Los principales géneros en los que están incluidos sus anamorfos son *Ambrosiella* (principalmente Microascales), *Raffaelea*, *Ceratocystiopsis* y *Dryadomyces* (de Ophiostomatales) (Cassar y Blackwell, 1996; Jones y Blackwell, 1998; Gebhardt *et al.*, 2005).

Como se había mencionado anteriormente, la mayoría de los escolítidos presenta una adaptación que consiste en llevar en el tegumento una mycangia o mycetangia. Éstas son estructuras especializadas que sirven para el almacenamiento, transporte y cultivo de los hongos ambrosía. Estas estructuras presentan varias formas que van desde simples hoyos en la superficie de la cutícula, cepillos de cerdas, a invaginaciones complejas equipadas con glándulas secretoras (Batra, 1963; Francke-Grosmann, 1967; Furniss *et al.*, 1987; Six, 2003). Las invaginaciones mycangiales ocurren en la cavidad oral, procoxas, protórax, mesotórax y en las bases de los élitros, entre otros (Francke-Grosmann, 1967; Beaver, 1989). El hongo crece saprofiticamente en las galerías de cría que los adultos hacen en la madera; sus esporas contaminan a los adultos que emergen del árbol huésped y éstas son transmitidas posteriormente a árboles sanos.

Los hongos *Ceratocystis* y *Fusarium* se han encontrado asociados al ataque de muchos insectos ambrosiales, especialmente de la familia Scolytidae. Estas dos especies ocasionan marchitamientos, manchados vasculares y chancros. Un ejemplo es la muerte descendente en el nogal negro (*Juglans nigra*), enfermedad atribuida a *Fusarium lateritium* y *F. oxysporum*, asociados al escarabajo ambrosial *Xylosandrus germanus* (Bonello *et al.*, 2001). Por su parte,

Fusarium circinatum causa la enfermedad del chancro resinoso en *Pinus radiata*, en la que se han identificado como insectos vectores escarabajos del género *Pityophthorus* (Coleoptera: Scolytidae).

Rojas y colaboradores (1999) aislaron a *Fusarium solani* (Martius) de hembras adultas del barrenillo del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) de dos poblaciones distintas, una de America (Mexico) y la otra de Africa (Benin). También se logró aislar de esta misma especie de escolítidos distintos hongos saprofitos y entomopatógenos, entre cuyos géneros se identificaron las especies *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium brevicompactum*, *Verticillium* sp., *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, y *Paecilomces lilacinusc* (Vega *et al.*, 1999). Asimismo, investigaciones realizadas en Colombia descubrieron una nueva especie del genero *Corthylus* que atacaba a las plantaciones de aliso, *Alnus acuminata*, y que estaba asociada en simbiosis con varios hongos como *F. solani*, *Fusarium* sp. , *Ceratocystis* sp. y una levadura (Gil *et al.*, 2004).

También se han asociado otros escolítidos a los hongos *Ips typographies* y *Ceratocystis polonica* en *Picea abies*, los cuales producen muerte de arboles por ataque en los haces vasculares y cambium, ocasionando un manchado azul (Krokene y Solheim, 1998). Asimismo, *Ceratocystis fimbriata* produce ataques en cacao, mango y eucalipto que están asociados a insectos perforadores de la madera como *Xyleborus* sp., y que ocasionan la muerte descendente en los arboles (Wingfield *et al.*, 1993). Por último se pueden mencionar a las especies *Dendroctonus frontalis* y *D. brevicomis*, que se hayan asociadas a los hongos *Entomocorticium dendroctoni*, *Ceratocystiopsis* sp, *Ophiostoma minus* y *O. nigracarpum*, habiéndose encontrado estos dos últimos adheridos externamente a la cutícula del insecto (Paine *et al.*, 1997).

1.2.2. Interacción cecidómidos y hongos fitopatógenos.

Los cecidómidos son una familia de dípteros nematóceros conocida como mosquitos formadores de agallas. Esta familia incluye especies de plagas de importancia económica en granos, frutas y verduras, así como importantes especies depredadoras de áfidos, cochinillas y

hormigas. Las larvas muestran una gran variedad de hábitos alimenticios, incluyendo hábitos fungívoros, herbívoros y depredadores de varios artrópodos (Gagné, 2004).

Se conocen aproximadamente 5.500 especies de cecidómidos que inducen agallas (Gagné, 2010). Uno de los procesos evolutivos que ha experimentado este grupo, relacionado con la eficiencia en la alimentación de las larvas, implica una relación íntima con hongos (Neger, 1908; Doctors van Leeuwen, 1939; Rohfritsch, 1992a; Kehr y Kost, 1999). Se ha sugerido que la costumbre de la alimentación de plantas evolucionó a partir de una especie ancestral mycetófaga (Mamaev, 1975; Gagné, 1989; Roskam, 1992 y 2005). Los prerequisites clave para pasar de insectos fungívoros a la fitofagia y posteriormente a la inducción de agallas, incluyen la modificación de las piezas bucales a picadoras-chupadoras y la simplificación del tubo digestivo y la digestión extraintestinal (Mamaev, 1975).

A las pocas horas después del ataque larval, las células de las heridas producidas por los insectos, así como células de las diversas capas adyacentes, muestran una activación evidente (Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Rohfritsch, 1992b). La alimentación por succión en la pared de las células activadas induce a estas células a mantener un estado dinámico y el tejido se convierte en agallas (Kirst y Rapp, 1974). El ataque de larvas estimula el crecimiento e induce diferenciación del tejido. Las células nutritivas son esenciales para el desarrollo de las larvas y juegan un papel clave en la organización de agallas (Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Rohfritsch, 1992b).

Las especies que inducen agallas de las tribus Asphondyliini y Lasiopterini difieren de la mayoría de los cecidómidos (Mamaev, 1975). Las larvas muestran características de su ancestral hábito mycetófaga, similar a las especies de mycetófagas no irritantes de las tribus Cecidomyiini y Oligotrophini. En las agallas de Lasiopterini y Asphondyliini no se induce a la formación de tejido nutritivo, sino que está presente micelio fúngico que tiene las características citoquímicas típicas de un tejido nutritivo (Meyer, 1987; Bronner, 1992; Yukawa y Rohfritsch, 2005). Las especies de mosquitos Asphondyliini atacan a estructuras reproductivas como flores y botones, mientras que las de Lasiopterini son capaces de utilizar un medio rico en micelio de hongos saprofitos y productos de descomposición de tejidos de la planta. El daño producido por el mosquito en las plantas se deriva de una acción sinérgica con el hongo asociado (Mamaev, 1975).

Algunos trabajos realizados sobre la biología de estos sistemas, especialmente en Lasiopterini, indican que los huevos son depositados junto con el hongo (Rohfritsch, 1997), en la superficie de los órganos diana o en galerías (orificios) hechos por otros insectos, como Coleópteros (Solinas, 1967; Coutin y Faivre-Amiot, 1981), picadas de algunos dípteros tephritidos (De Laurentiis, 1993) o en las agallas desocupadas (Yukawa y Haitzuka, 1994). Por otro lado, se ha descubierto que las hembras adultas tienen mycangias asociadas con el hongo, las cuales se encuentran en el esternito del VII segmento abdominal en *Asphondyliini* y VIII o IX segmento abdominal en Lasiopterini y Alycaulini (Borkent y Bissett, 1985; Bissett y Borkent, 1988; Yukawa y Rohfritsch, 2005; Rohfritsch, 2008). Por lo tanto, la relación entre estos mosquitos especializados y los hongos asociados se considera como mutualismo (Bissett y Borkent, 1988; Rohfritsch, 1992a,b; Adair *et al.*, 2009; Heath y Stireman, 2010).

Adair *et al.* (2009) señalaron que especies del género *Asphondylia* en Australia y Sudáfrica están asociadas con amplias comunidades de hongos en sus agallas, siendo *Botryosphaeria dothidea*, en Australia el hongo más abundante y a veces el único presente. Es además la especie primaria implicada en formar una relación mutualista con *Asphondylia*. También en Australia, Label *et al.* (2012) encontraron hongos pertenecientes a un amplio rango de familias en la superficie externa de *Asphondylia floriformis* y *A. sarcocorniae* sobre *Sarcocornia quinqueflora*, y *A. tecticorniae* y *A. peepei* sobre *Tecticorniae arbuscula*. Sin embargo, sólo *Botryosphaeria dothidea* ha sido aislado de las cámaras larvales en las cuatro especies y en las dos plantas mencionadas.

Los hongos no sólo proporcionan nutrición a Lasiopterini sino que también inducen la lisis de las células de la lámina medular del tallo y abren un canal hasta los haces vasculares. Las larvas de *Lasioptera arundinis* (Schiner) (Lasiopterini) siguen al hongo y se alimentan de su micelio junto con células adyacentes de *Phragmites australis* (Cav.) Trin. (*Poaceae*). Por otro lado, las larvas de *Schizomyia galiorum* Kieffer (*Asphondyliini*) no pueden iniciar agallas o desarrollarse en las flores de *Galium mollugo* L. (*Rubiaceae*) sin el hongo asociado.

Investigaciones realizadas por Shun *et al.* (2012) sobre la asociación del cecidómido *Illiciomyia yukawai*, y sus hongos simbioses en Anís estrellado japonés, *Illicium anisatu*, indicaron que el número de especies de hongos aislados de las agallas aumentaba con el

desarrollo de éstas, mientras que el número aislado de las hojas mostraba una tendencia diferente. *Botryosphaeria dothidea* era el hongo dominante en las agallas desde Junio a Octubre y después de este periodo, llegaban a ser dominantes los hongos *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp. y *Pestalotiopsis* sp.

Aunque *B. dothidea* no se aisló de las hojas, se detectó en más del 90% de los aislamientos realizados a partir de las mycangias y puestas de huevos. Por otro lado, *B. dothidea* no se aisló de mycangias de adultos emergidos de agallas que habían sido confinadas en bolsas de plástico. Esto sugiere que *I. yukawai* está estrechamente asociado con *B. dothidea* y que los adultos recién emergidos no incorporan el hongo en la mycangia directamente de las agallas donde se habían desarrollado. Además, el hongo que forma las capas de agallas ambrosía tiene menos capacidad para propagarse en medios artificiales a pesar de la presencia de una masa micelial en agallas maduras (Shun *et al.*, 2012).

De lo expuesto anteriormente se deduce que el género *Botryosphaeria* está bastante extendido en las asociaciones de muchas especies de cecidómidos. Es un hongo endófito común en muchas plantas (Smith *et al.*, 1996; Slippers y Wingfield, 2007), afectando a varios cultivos de importancia económica (Swart y Wingfield, 1991; Inderbitzin *et al.*, 2010). Algunas especies, incluyendo *B. dothidea*, tienen un amplio rango de huéspedes (Slippers y Wingfield, 2007), entre los cuales se encuentra el olivo en el que causa la enfermedad conocida como Escudete.

2. Principales plagas y enfermedades del olivo.

El olivo, *Olea europea* (Linnaeus, 1764) (Oleales: Oleaceae), es un cultivo de gran importancia económica en la mayoría de los países de la Cuenca Mediterránea. En el año 2010 se produjeron en el mundo más de ocho millones de toneladas de aceitunas. España ocupa la primera posición mundial en producción de aceitunas, suponiendo el 38,9% de la producción mundial y el 59,8% de la Unión Europea (FAO, 2010).

En España, como en la mayoría de los países mediterráneos, el agroecosistema del olivar se ve afectado por múltiples factores que interaccionan en su desarrollo y producción, entre los que destacan las plagas y enfermedades. Éstas producen en el cultivo pérdidas

anuales de producción cercanas al 23%, de las cuales el 20% sería atribuible a daños causados por insectos y un 3% a enfermedades.

La importancia económica, social e histórica del olivo ha impulsado el desarrollo de numerosas investigaciones que han generado abundante información sobre las plagas y enfermedades que afectan al olivar, principalmente en la Zona Mediterránea (Civantos, 1999; De Andrés-Cantero, 2001; Alvarado, 2004; Tzanakakis, 2006; Trapero-Casas y Blanco-López, 2010).

Según Alvarado *et al.* (2010), las plagas del olivo se han clasificado en dos grupos atendiendo a su importancia económica. El primero lo forman las plagas principales: la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*), la polilla o prays (*Prays oleae*), el gusanado (*Euzophera pingüis*), la cochinilla de la tizne (*Saissetia oleae*) y la cochinilla violeta o parlatoria (*Parlatoria oleae*). El segundo grupo lo constituyen plagas secundarias, menos perniciosas, que se desarrollan en determinadas aéreas o condiciones y pueden causar graves daños: el algodoncillo (*Euphillura olivina*), el barrenillo del olivo (*Phloeotribus scarabaeoides*), el barrenillo negro (*Hylesinus oleiperda*), la serpeta (*Lepidosaphes ulmi*) y el gusano blanco (*Melolontha papposa*).

Por otra parte, se conocen más de 50 enfermedades que afectan al olivo, incluyendo las causadas por hongos, bacterias, virus, fitoplasmas, nematodos, fanerógamas parásitas y agentes abióticos. Sin embargo, sólo unas pocas de ellas tienen importancia económica, destacando las causadas principalmente por hongos: la Verticilosis causada por *Verticillium dahliae* Kleb, el repilo (*Fusicladium oleagineum*), la antracnosis del olivo o aceitunas jabonosas (*Colletotrichum* spp), el emplomado (*Pseudocercospora cladosporioides*), el Escudete (*Botryosphaeria dothidea*), y la enfermedad bacteriana de la tuberculosis, causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Rodríguez-Navarro, 2006; Trapero-Casas y Blanco-López, 2010). Un aspecto de la epidemiología de las enfermedades del olivo no considerado hasta ahora es la posible transmisión de los patógenos por diversos insectos. Esto parece particularmente importante en el caso de la Verticilosis y de las podredumbres de frutos debidas a *Colletotrichum* spp. y *B. dothidea*.

En esta tesis doctoral se han planteado investigaciones que pretenden dar respuesta a la posible implicación de ciertas plagas del olivo, como la mosca *Bactrocera oleae* y el barrenillo *Phloeotribus scarabaeoides*, en la dispersión de los patógenos causantes de la Verticilosis del olivo (*Verticillium dahliae*) y del Escudete de la aceituna (*Botryosphaeria dothidea*). Por ello a continuación desarrollaremos una revisión centrada en estas dos plagas y las dos enfermedades que nos situé en su estado actual.

2.1. Mosca del olivo (*Bactrocera oleae* Gmelin).

La mosca del olivo se considera como la plaga más importante del cultivo del olivo, debido a las considerables pérdidas que provoca en la cosecha, tanto en aceituna de mesa como de almazara, afectando a la cantidad y calidad de los aceites obtenidos (Delrio, 1979; Michelakis y Neuenschwander, 1983; Aldebis y Vargas-Osuna, 2003; Alvarado *et al.*, 2010).

La mosca del olivo (*Bactrocera oleae*, Gmelin) es un insecto díptero de la familia Tephritidae que se encuentra por toda la Zona Mediterránea: sur de Europa, norte de África y Oriente Medio, así como a lo largo de la costa este de África hasta Sudáfrica. También está presente en California (Estados Unidos), donde fue detectada por primera vez en 1998 (Delrio, 1979; Michelakis y Neuenschwander, 1983; Civantos, 1999; Augustinos *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2003). En España es muy conocida en todas las zonas olivareras, aunque sus daños son distintos según las diferentes regiones. Así, se ha demostrado que su incidencia en el olivo varía si se trata de una zona endémica (zonas con elevada humedad relativa y temperaturas sin grandes variaciones, como el litoral levantino) donde los ataques son muy elevados, o zonas más interiores, con clima algo más continental, donde la presencia es menos intensa y en algunas ocasiones nula (Aldebis y Vargas-Osuna, 2003; Armendáriz *et al.*, 2009).

2.1.1. Descripción morfológica.

El adulto es un pequeño díptero que mide de 4 a 5mm de longitud y de 10 a 12mm de ancho. La cabeza es de color amarillo, con ojos compuestos, grandes, rojizos y antenas pequeñas. El tórax es de color marrón oscuro, recubierto de una fina pubescencia de color gris, con dos o tres rayas longitudinales de color gris o negro. Las alas son alargadas y transparentes, presentando pequeñas manchas negras oscuras en el ápice. El abdomen es de

color marrón con manchas negras oscuras en los lados de cada segmento (este carácter es bastante variable). Las hembras (Figura 1 A) son algo mayores que los machos (Figura 1 B), distinguiéndose de éstos por una estructura puntiaguda de color oscuro (oviscapto) de 1mm de longitud (Rice, 2000; Tzanakakis, 2005).

El huevo es de color blanco lechoso, cilíndrico, alargado, con la superficie lisa y muy pequeño, de dimensiones aproximadas de 0,7mm de largo y 0,2mm de diámetro (Figura 1 C) (Tzanakakis, 2005; Cappello *et al.*, 2008). La larva adquiere un color blanco amarillento (Figura 1 D), es ápoda y de forma cilíndrocónica, completa su desarrollo pasando por tres estadios larvarios muy característicos, y en su máximo desarrollo llega a medir de 7 a 8mm de longitud y 1,3 a 1,4mm de diámetro (Vossen *et al.*, 2004; Tzanakakis, 2005).

La pupa elíptica y alargada, tiene entre 3,5 a 4,5mm de longitud y 2mm de diámetro (Figura 1 E), y su color es amarillo claro al principio pero se va convirtiendo en marrón con la edad (INRA, 2003; Tzanakakis, 2005; Cappello *et al.*, 2008; Alvarado *et al.*, 2010).

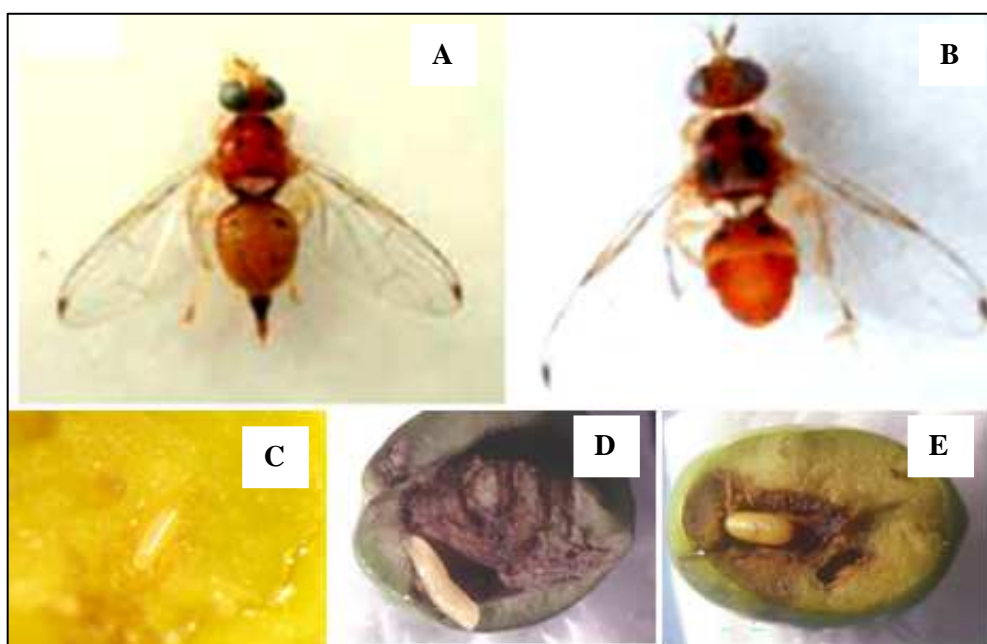


Figura 1 . Mosca del olivo *Bactrocera oleae*, Adulto [Hembra (A) y Macho (B)], Huevo (C), Larva (D) y Pupa (E).

2.1.2. Ciclo biológico.

En el invierno la mayoría de la población se encuentra en estado de pupa, enterrada debajo de los árboles a una profundidad de 3cm si el suelo está compacto, o algo más (8 a 10cm) si el suelo se labra (Aldebis y Vargas-Osuna, 2003). Una pequeña parte de la población pasa el invierno en estado adulto, correspondiéndose a la fracción más adelantada que, por encontrarse al inicio del invierno en las zonas más resguardadas, evolucionó a estado adulto (Civantos, 1999).

Los adultos de la primera generación emergen de Marzo a Mayo, dependiendo de la latitud y la temperatura. Éstos se alimentan de los líquidos azucarados que pueden encontrar en el árbol, en los exudados de las flores, en lesiones de los frutos y en las lesiones producidas por homópteros. Estas sustancias nitrogenadas son necesarias para la producción de huevos (Weems y Nation, 2003; Alfaro, 2005).

Pasado el periodo de madurez sexual (6 a 10 días), los adultos se buscan y se acoplan siempre parados en algún sitio del árbol y al atardecer (Crovetti, 1996; De Andrés-Cantero, 2001). La hembra empieza la puesta en aquellos frutos que se ajustan a las condiciones que ésta exige, realizando una picadura muy característica mediante el oviscapto. Así, prepara una pequeña cámara bajo de la cutícula de las aceitunas para depositar sus huevos, que pueden llegar a la cantidad de 10 a 12 huevos al día, y alrededor de 200 a 250 en todo el periodo reproductivo. Sin embargo, lo más normal es que la hembra ponga un sólo huevo por fruto, aunque cuando la cosecha es escasa o el ataque es fuerte se pueden encontrar varias picadas por aceituna (Rice, 2000; De Andrés-Cantero, 2001; Aldebis y Vargas-Osuna, 2003; Weems y Nation, 2003). En algunos casos, debido al comportamiento de la puesta de la hembra, se encuentran cámaras sin huevo (picada sin huevo) (Aldebis y Vargas-Osuna, 2003).

Después de un periodo de incubación variable (de 3 a 8 días) según las condiciones climáticas, nacen la larvas que comienzan a alimentarse de la pulpa del fruto (mesocarpio). De esta forma excavan galerías superficiales que se van haciendo cada vez más profundas a medida que la larva se desarrolla, llegando al hueso (endocarpio). Las larvas más desarrolladas se transforman en pupas. Durante el verano lo hacen en el interior del fruto cercanas a la epidermis, mientras que las de la última generación pupan en el invierno,

enterrándose en el suelo a poca profundidad 3 a 6cm. La duración pupal es de 8 a 10 días en verano, mientras que duran hasta 6 meses en el invierno (Aldebis y Vargas-Osuna, 2003; Alfaro, 2005; Alvarado *et al.*, 2010).

La duración media y el número de generaciones es variable dependiendo principalmente del factor térmico, que influye tanto en las fases fenológicas de la planta como en el desarrollo del propio insecto (Crovetti, 1996). Otros factores que pueden afectar son la humedad relativa, las condiciones de cultivo, las prácticas agronómicas, etc. Normalmente, en el verano cuando las temperaturas son óptimas una generación puede completarse en 32-36 días, mientras que en el otoño se pueden llegar a 60 días (Civantos, 1999).

Por todo esto, en las zonas con clima continental sólo hay dos o tres generaciones al año, mientras que en las zonas costeras mediterráneas normalmente hay tres, aunque algunos autores han citado un número más elevado (Civantos, 1999).

2.1.3. Factores que influyen en el desarrollo de las poblaciones de *Bactrocera oleae*.

El desarrollo de la mosca del olivo *B. oleae* depende de muchos factores entre los incluyen factores abióticos, genéticos o agronómicos y bióticos.

Los principales componentes abióticos del ecosistema que intervienen de manera directa en el ciclo biológico de la mosca del olivo son la temperatura, la humedad relativa y la precipitación (Zalom *et al.*, 2003).

La temperatura es el factor climático de mayor impacto sobre el desarrollo de *B. oleae*. Las temperaturas comprendidas entre 6°C y 35°C y las larvas y pupas entre 6°C y 30°C, mientras que las temperaturas entre 5°C y 37°C son adecuadas para el desarrollo del huevo siendo la optima 27 °C (Aldebis y Vargas-Osuna, 2003).

La humedad relativa influye particularmente en la supervivencia de los huevos y las larvas de la mosca del olivo (De Andrés-Cantero, 2001). Durante el verano, la humedad inferior al 20%, combinada con las elevadas temperaturas, pueden provocar una alta mortalidad (90%) en huevos y larvas recién nacidas y adultos de *B. oleae* (Delrio y Prota,

1976; Pucci *et al.*, 1985). Igualmente, durante el otoño e invierno la acción combinada de las temperaturas bajas y de la alta humedad del suelo puede causar una gran mortalidad en las pupas enterradas, sobre todo en suelo compacto. Como consecuencia, la presencia de *B. oleae* es más abundante en zonas costeras que en las continentales (Aldebis y Vargas-Osuna, 2003; Armendáriz *et al.*, 2009).

La alta temperatura y la baja humedad pueden tener impacto en la maduración del ovario, en la duración de la vida del insecto, en la distancia de vuelo y en la mortalidad de los adultos (hembras) de *B. oleae*. En estudios realizados por Fletcher *et al.* (1978) se demostró que las altas temperaturas (26 a 29°C) y baja humedad (45 ± 50%) inhibían la maduración del ovario de las hembras de *B. oleae* independientemente del estado de alimentación.

La disponibilidad de agua para los adultos puede aumentar su supervivencia a temperaturas entre 38 a 43°C. Tremblay (1990) señaló que los adultos expuestos a temperaturas de 40°C mueren dentro de las dos primeras horas. Sin embargo, bajo condiciones similares de temperatura, pueden sobrevivir hasta 3 días si tienen una fuente de agua disponible.

Las plantaciones de olivar en regadío (aceitunas de mesa o para almazara) son más susceptibles a los ataques de mosca que las plantaciones en régimen de secano, debido al microclima húmedo que reduce los efectos nocivos de las altas temperaturas y también la mortalidad de huevos y larvas (Cappello *et al.*, 2008).

Entre los factores genéticos o agronómicos influye también la variedad del olivo. Los adultos de las primeras generaciones pican las aceitunas que se encuentran en las variedades tempranas, que son más atacadas al principio. Por el contrario, en las últimas generaciones la mosca ataca los frutos de variedades tardías. Las variedades españolas Gordal, Manzanillo y Hojiblanca son las más susceptibles al ataque de la mosca (Civantos, 1999; Aldebis y Vargas-Osuna, 2003).

Los adultos de *B. oleae* prefieren las aceitunas de gran tamaño para poner su puesta, por ello las variedades con fruto de gran tamaño son más susceptibles al ataque de la mosca (Pucci y Ambrosi, 1981; Dominici *et al.*, 1986; Neuenschwander *et al.*, 1985; Iannotta *et al.*,

2006). Por otro lado, el desarrollo larval se ve influenciado por el tamaño del fruto y la pulpa, así como el contenido de agua. Los frutos grandes tienen alto contenido de agua, ofreciendo una mejor protección contra altas temperaturas del verano y reduciendo el riesgo de desecación, por lo que aumenta la supervivencia larvaria (Aldebis y Vargas-Osuna, 2003).

La aplicación de herbicidas bajo los árboles para facilitar la recolección es una práctica que incrementa la población de mosca, mermada tradicionalmente por las labores con arado que se realizaban bajo los olivos al final del invierno, y que destruían muchas de las pupas que se hallaban enterradas (De Andrés- Cantero, 2001).

Por último, los factores bióticos se identifican como la acción los enemigos naturales de la mosca del olivo. Éstos son principalmente depredadores y parasitoides (Cappello *et al.*, 2008), aunque se han citado algunos microorganismos entomopatógenos. En todo caso, el parasitismo es muy escaso y afecta muy poco a las poblaciones de la moca del olivo.

2.1.4. Daños ocasionados e importancia económica.

Los factores responsables de las pérdidas económicas producidas por la mosca del olivo incluyen los daños directos por caída de frutos y pérdida de peso y los indirectos, debidos al deterioro en la calidad de los aceites producidos en las zonas afectadas por el insecto.

En Sardinia (Italia) se estimaron pérdidas por caída de frutos del 37%, en el periodo desde 1953 a 1955 y del 20% en el periodo entre 1974-1976. En la antigua Yugoslavia y Grecia se estimaron en el 30% (Civantos, 1999).

Los diferentes autores que han estudiado la pérdida de peso debida a la actividad alimenticia de las larvas estiman que ésta varía entre el 10 y el 30% en los frutos afectados (Economopoulos *et al.*, 1982; Mazomenos, 1989; Michelakis, 1990; Katsoyannos, 1992; Weems y Nation, 2003; Alfaro, 2005; Alvarado *et al.*, 2010).

Por su parte, la pérdida de calidad de los aceites se debe a que en las galerías producidas por la larva se instala una variada microflora que, en condiciones óptimas de

desarrollo (alta humedad y temperatura templada), altera el índice de acidez y también la calidad organoléptica (Mazomenos *et al.*, 1997; Civantos, 1999; Caballero, 2001; Alvarado *et al.*, 2010). Esta pérdida es difícil de valorar, pues depende de muchos factores como la cantidad de fruto afectado, las condiciones climáticas durante la recolección, el manejo de la aceituna tras la recolección, etc. En cualquier caso, se puede afirmar que para obtener aceites de calidad es necesario emplear frutos sin ataque de mosca (Alvarado *et al.*, 2010).

En aceituna de mesa los frutos picados deprecian totalmente las partidas que los contienen, siendo los porcentajes admisibles de un 3% de frutos dañados.

Otros daños indirectos que pueden ser de importancia son las enfermedades, en cuyo desarrollo la mosca de olivo puede tener cierta implicación. Así, las heridas producidas por la puesta de la hembra adulta y las galerías producidas por las larvas favorecen el desarrollo de los hongos que causan la podredumbre de los frutos, como *B. dothidea*, causante del Escudete, y *Colletotrichum pp.*, agente causal de las “Aceitunas Jabonosas”. También la mosca transmite la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, causante de la Tuberculosis del olivo, y entre los que parece existir una relación simbiótica.

2.1.5. Estrategias y métodos de control de la mosca del olivo.

Las medidas para el control de *B. oleae* tienen como objetivo evitar que la hembra realice la puesta en aceitunas. Para conseguirlo es necesario diseñar un programa adecuado de manejo integrado, que suponga la aplicación oportuna de diversos métodos de control, culturales, biológicos y químicos. En este sentido, se ha puesto en marcha un programa para el control de esta plaga dentro del marco de la producción integrada en el cual intervienen varias asociaciones y la administración, que incluye a ATRIAS, APIS, técnicos RAIF y técnicos de la Red de alerta de la mosca del olivo, etc.

Control integrado de *Bactrocera oleae*.

En la protección integrada el seguimiento de las poblaciones es fundamental, ya que nos permite conocer la situación y evolución de la población del insecto. La estimación cuantitativa de los niveles de población de *B. oleae* se realiza para adultos y estados

inmaduros (huevos, larvas y pupas). Ésta tiene como objetivo conocer los umbrales de ataque de la plaga que nos permitan decidir la aplicación de los tratamientos adecuados en los momentos oportunos y conseguir la máxima efectividad.

Para determinar el nivel de adultos es necesario capturar los adultos de la mosca mediante trampas. Actualmente se utilizan dos tipos de trampas: la trampa olfativa (mosqueros) del tipo McPhail, que se ceba con fosfato biamónico al 4%, o proteínas hidrolizables al 1%; y la trampa cromotrópica-sexual, que consta de una lámina de color amarillo limón engomada en las dos caras que están cebadas con una cápsula de feromona sexual (PVC) que contiene la feromona de la hembra. Las trampas se colocan en la zona sur y al exterior del árbol, debiéndose colocar un mínimo de dos trampas (de uno u otro tipo) por hectárea (Aldebis y Vargas-Osuna, 2003).

Los niveles de estados preimaginales se determinan mediante el conteo de huevos y larvas, a partir de muestras de aceitunas. Los muestreos comienzan en el momento en que se observan las primeras picadas y se extienden hasta un mes antes de la recolección, con una frecuencia semanal. El tamaño muestral varía según si la producción del olivar se destina a almazara o a mesa, y se separan los grupos de aceitunas picadas, con o sin formas vivas, y aceitunas sin picadas. Los datos así obtenidos, junto con los de capturas de adultos en trampa, nos indicarán cuándo debe realizarse el tratamiento respetando los umbrales establecidos para la intervención (Montiel-Bueno y Madueño, 1995a,b; Aldebis y Vargas-Osuna, 2003; Alvarado *et al.*, 2010).

Durante la elección de los sistemas de lucha más adecuados, la secuencia lógica y deseable de aplicación es la siguiente: métodos culturales, métodos biológicos, métodos biotécnicos y lucha química, recurriendo a este último método sólo cuando no haya otro método de control eficaz disponible.

Medidas basadas en las prácticas agronómicas.

Estas medidas se consideran complementarias y pretenden reducir los focos de infestación mediante recolección temprana, recogida y destrucción de aceitunas atacadas (del árbol y caídas al suelo), realización de labores de suelo para destruir las pupas invernadas y,

por último, la limpieza cuidadosa de las almazaras, especialmente las trojes con el propósito de destruir las pupas.

Medidas biológicas.

Se basan en fomentar el control natural favoreciendo los enemigos naturales mediante plantación y/o conservación de cubiertas vegetales y liberación de enemigos naturales.

El complejo parasitario de la mosca en la Cuenca Mediterránea no es abundante y está representado esencialmente por cuatro himenópteros calcídidos ectófagos: *Eurytoma martellii* (Dom.), *Eupelmus urozonus* (Dalm.), *Pnigalio mediterraneus* (Ferr. y Del.) y *Cyrtoptyx latipes* (Rond.) y un himenóptero braconídeo endófago, el *Opius concolor* (Szepl.), presente en el Área Mediterránea únicamente en el norte de África, Palestina, Turquía, Creta, Sicilia y Cerdeña. Entre éstos, se tenían grandes esperanzas después de realizar los estudios de comportamiento y aclimatación del parasitoide *Opius concolor*, pero se ha demostrado que en extensas áreas del norte del Mediterráneo sólo son eficaces si se realizan importantes sueltas al inicio de la generación del verano. Posteriormente, al producirse la explosión poblacional de *B. oleae* al inicio del otoño, el parásito es incapaz de controlar las poblaciones del hospedante (Civantos, 1999). En Túnez, el parasitismo natural de *O. concolor* puede alcanzar tasas del 90%, (Civantos, 1999).

En Italia se han obtenido resultados esperanzadores en sueltas experimentales de *Eupelmus eurozonus* Dalm., cuya cría artificial se ha puesto a punto sobre *Ceratitis capitata*.

Respecto a los depredadores de la mosca del olivo, sólo existe una especie importante, el cecidómido *Prolasioptera berlesiana* (Arambourg 1986; De Andrés-Cantero, 2001), que en condiciones favorables puede reducir las poblaciones de la plaga hasta un 30% (Civantos, 1999). Sin embargo, muchos autores consideran que los perjuicios de esta especie son mayores que sus beneficios, ya que se considera el principal responsable de la dispersión del hongo causante del Escudete. En epígrafes posteriores se revisará con detalle la interacción de esta especie y la enfermedad mencionada.

En cuanto a los microorganismos entomopatógenos, éstos tienen una acción muy limitada sobre esta plaga debido a los hábitos de alimentación endófito de sus larvas. De Andrés-Cantero (2001) cita a las bacterias *Bacillus sphaericus* y *B. cereus* entre los enemigos naturales de *B. oleae*.

Métodos biotécnicos.

Las sustancias atrayentes, como las feromonas sexuales, se emplean cuando se aplican técnicas de trampeos masivos y confusión sexual. Las sustancias olfativas o alimenticias están compuestas de proteínas hidrolizadas y sales amoniacales de lenta liberación, hormonas juveniles, etc.

El trampeo masivo consiste en la captura del mayor número posible de insectos mediante trampas diseñadas para tal efecto, cebadas con un atrayente (feromona o atrayente alimenticio) y un insecticida en ciertos casos. En el olivar se puede plantear la opción de los trampeos masivos mediante el uso de trampas tipo Olipe (botella de pet con orificios de 5mm cebadas con atrayente alimenticio) como alternativa a los tratamientos convencionales, particularmente en olivar ecológico, olivares situados en parques naturales etc. Su capacidad de capturar, así como el bajo coste que originan son razones suficientes para considerar a este tipo de control como una alternativa eficaz (Altolaguirre-Obrero *et al.*, 2003). La Junta de Andalucía ha apostado por este sistema subvencionando medios de trampa y atrayentes en las zonas que se han mencionado. La Alpujarra, en Granada, y los Pedroches, en Córdoba, entre otras, han utilizado las trampas tipo Olipe contra la mosca, haciendo uso de las ayudas contempladas en el Programa de Mejora del Aceite de Oliva (BOJA, 2005).

Por su parte, la técnica de la confusión sexual se basa en la interrupción de la comunicación química entre los individuos de la especie diana (Ortiz *et al.*, 1999). La práctica consiste en situar en el campo una serie de emisores de feromona sintética, expandiéndola en toda el área infestada en una concentración suficiente para saturar los receptores de los machos que quedan desorientados y pierden rastro de las hembras. Esto provoca una disminución drástica de los apareamientos y, en consecuencia, una reducción de la población. Sin embargo, el éxito de este procedimiento depende de muchos factores, como el mecanismo de liberación de la feromona, la dinámica poblacional de la plaga (Cardé y Minks, 1995), el

número y tipo de emisores (Sauer y Karg, 1998) y la eficacia de la formulación (Thorpe *et al.*, 1999). Según Montiel-Bueno *et al.* (1982) y Montiel-Bueno y Simón (1985), la aplicación de esta técnica logró reducir de manera sensible las poblaciones preimaginales que se desarrollan en los frutos, obteniéndose una eficacia práctica muy elevada. Estos autores indicaron, no obstante, que la tecnología de confusión sexual en *B. oleae* era muy rudimentaria, siendo necesario perfeccionarla si se pretende utilizar como un medio práctico de lucha contra la plaga.

Medidas químicas.

Los olivicultores han diseñado a lo largo del tiempo métodos tradicionales de lucha contra la mosca del olivo, basados exclusivamente en el uso de pesticidas químicos convencionales. La actuación puede ir dirigida contra los insectos adultos o bien contra los estados preimaginales de la plaga.

Tratamientos adulticida.

El tratamiento adulticida se aplica de dos formas. La primera mediante aplicaciones aéreas UBV, tratamiento que se realiza en bandas de 25m de anchura, empleándose por hectárea tratada 500cc de dimetoato al 40%, 0,5kg de proteína hidrolizada y 20L de agua. La segunda consiste en pulverizar una superficie de 1 a 2m² de la copa del árbol en la parte orientada al sur, con una solución que contenga 600cc de dimetoato al 40%, 1kg de proteína hidrolizada y 100L de agua (Aldebis y Vargas-Osuna, 2003). El primer tratamiento se aplica cuando el número de capturas es igual o mayor a 5 adultos por trampa al día y el número de hembras fértiles supera el 60%. Los tratamientos siguientes se realizan cuando se captura un adulto o más por trampa al día y las hembras fértiles alcanzan o superan el 60% y, además, el número medio de huevos por trampa al día es igual o mayor a 10 y los frutos con formas vivas iguales o superiores al 3%.

Tratamiento larvicida.

Se aplica cuando el 10 o 15% de frutos atacados con picadas de mosca presentan formas vivas. Consiste en pulverizar la totalidad del árbol con un insecticida órgano-

fosforado, penetrante o sistémico, que mate a la larva en el interior de la aceituna (Civantos y Jiménez, 1994; Aldebis y Vargas-Osuna, 2003).

2.2. Barrenillo del olivo (*Phloeotribus scarabaeoides* Bernard).

El barrenillo del olivo, *Phloeotribus scarabaeoides* (Bernard 1978) (Coleóptera: Scolytidae), se considera una plaga secundaria del olivar en la Cuenca Mediterránea. Esta especie ataca a las plantas de la familia *Oleaceae*, particularmente al olivo. La morfología y biología de esta especie ha sido descrita en diversos trabajos (Russo, 1938a,b; Balachowsky, 1949; Arambourg, 1986; González, 1990) que se revisan a continuación.

2.2.1. Descripción morfológica.

Los adultos miden de 2 a 2,5mm de longitud y 1,5 a 2mm de anchura y son de cuerpo grueso y color pardo negruzco, enteramente recubierto de una fina pubescencia grisácea. La cabeza se halla encajada en el protórax y en la frente se insertan las antenas, caracterizadas por terminar en una maza flabeliforme de tres largos artejos que la hacen semejar a un tridente. Los élitros recubren totalmente el abdomen (Figura 2 A y B) (Alfaro, 2005).

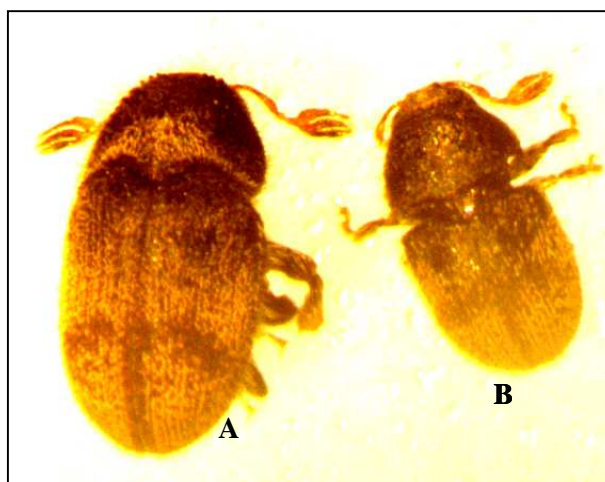


Figura 2. Adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* [Hembra (A) y Macho (B)], foto tomada por el autor de la tesis.

Los huevos son de color blanco amarillento, de forma ovalada, midiendo aproximadamente 0,75mm de longitud y 0,5mm de anchura. Las larvas son apodas, con el

cuerpo arqueado, de color blanco al principio y amarillento con posterioridad. Éstas carecen de ojos, su longitud varía desde 0,9mm al nacer a 3,8mm en su máximo desarrollo y su cabeza esta embutida en el primer segmento del tórax, con potentes mandíbulas con las que excavan la galería (Alfaro, 2005). Las ninfas son de color blanco, con una longitud de 2 a 3mm y presentando ojos compuestos y mandíbulas potentes de color marrón.

2.2.2. Ciclo biológico.

A finales de invierno los adultos aprovechan los restos de poda (ramas cortadas) para realizar la puesta. Las hembras excavan galerías en el interior de estas ramas, que se conocen como las galerías de reproducción (Figura 3 A) y que constan de dos brazos sobre cuyas paredes las hembras depositan los huevos. La hembra pone aproximadamente de 60 a 85 huevos, apareciendo en el exterior de la galería los típicos montoncitos de aserrín. Transcurrida la incubación, nacen las larvas y cada una de ellas abre una galería entre la corteza y la albura. Estas galerías larvarias o de cría son aproximadamente perpendiculares a las galerías de puesta, y casi paralelas, viniendo a medir unas a otras de 30 a 50cm de largo. El desarrollo larvario puede durar entre 40 y 60 días. Las larvas maduras construyen otras cámaras donde se transforman en pupa y posteriormente en adultos. En el periodo comprendido entre finales de Mayo y Julio los nuevos adultos emergen practicando orificios de salida de 1,5mm de diámetro que construyen atravesando la corteza. Los adultos que emergen se trasladan a los olivares próximos para alimentarse, atacando preferiblemente a árboles debilitados, en los que abren galerías de alimentación (Figura 3 B) de 2 a 3mm de profundidad en la base del brote, en una yema axilar, o ramitas de uno a tres años, lo que suele ocurrir en el mes de Junio. Los adultos de la segunda generación aparecen en Septiembre, de manera que algunos hibernan y otros se aparean para dar lugar a una tercera generación en Noviembre y que hiberna en estado adulto. Excepcionalmente puede ocurrir una cuarta generación (González, 1990; Benazoun, 1992).

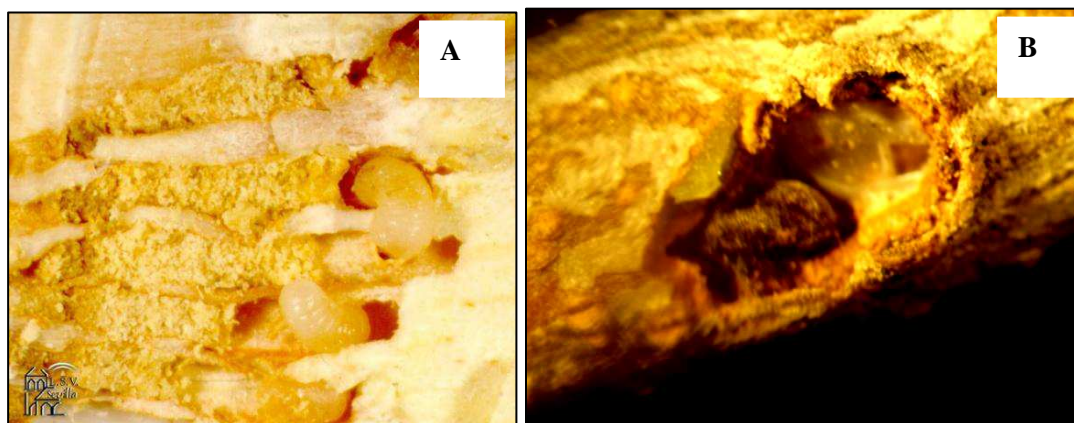


Figura 3. Galerías de *Phloeotribus scarabaeoides* [Reproducción (A) y Alimentación (B)].

2.2.3. Daños.

El adulto se traslada a los árboles y abre galerías nutricias en las ramitas de uno a tres años, tanto en ramillas florales como en las que tienen fruto. Estas galerías interrumpen el paso de la savia y provocan la seca y posterior caída de hojas, frutos y ramitas productivas, por lo que la cosecha de años sucesivos resulta afectada y el desarrollo vegetativo del árbol es deficiente. Además de la pérdida de cosecha, que puede llegar a estar por encima del 70%, los adultos de las últimas generaciones provocan la caída prematura de frutos que eleva el índice de acidez del aceite produciendo sabores no deseados (Benazoun, 1992; Humanes y Civantos, 1992; González y Campos, 1994). Otros daños colaterales del ataque de este insecto ocurren al favorecer el desarrollo de otras plagas y enfermedades, como el arañuelo y la Tuberculosis (Arambourg, 1984 y 1986; Civantos, 1999; Carlos-Alberte, 2006).

2.2.4. Estrategias y métodos de lucha.

El barrenillo es difícil de combatir directamente debido a que por su forma de vida pasa la mayor parte del tiempo en el interior de galerías. Por ello la lucha contra este insecto se basa fundamentalmente en medidas de tipo preventivas, que tienen como objetivo evitar o reducir los daños. Estas medidas de están ligadas al ciclo biológico del insecto y consisten en:

- Realizar la poda en el momento de máxima actividad reproductora del insecto. Esta intervención puede servir como estrategia de captura masiva de adultos, siempre y cuando la leña sea destruida antes de la emergencia de la nueva generación (Phillipsen *et al.*, 1986; Khonle *et al.*, 1992).

- Mantener palos-cebo de Febrero a Abril en lugares sombreados, con objeto de que no se sequen demasiado y sigan siendo atractivos para realizar la puesta. En Mayo, antes de que se produzca la salida de adultos, se procederá a su destrucción (González y Campos, 1991).

- Utilizar árboles como trampas para la atracción y matar los primeros adultos de *P. scarabaeoides*. Estos árboles pueden ser tratados con etileno junto con un insecticida (González y Campos, 1995; Campos y Peña, 1995; González y Campos, 1996).

En caso de ataques severos, con más del 10% de brotes con adultos vivos, se debe recurrir a los tratamientos químicos. Para ello, se tratarán los árboles en el momento en que se haya producido la salida de verano, mediante pulverizaciones con productos organofosforados u otras materias activas autorizadas. Los insecticidas se suelen aplicar en bandas de 200 a 300m alrededor de los focos de población de *P. scarabaeoides* (Civantos y Sánchez, 1993; Civantos, 1999).

Los enemigos naturales de *P. scarabaeoides* son escasos. En las familias Pteromalidae y Braconidae se han identificado el mayor número de géneros parásitos de esta especie. En trabajos realizados en Granada, los parásitos himenópteros disminuyeron sus poblaciones durante los años 1986-1988, bajo condiciones de laboratorio, en una media del 20,6% por año, siendo el 93% de esta disminución atribuida a los Petromalidos *Cheiopachus quadrum* y *Raphitelus maculatus* (González y Campos, 1990).

2.3. Verticilosis del olivo (*Verticillium dahliae* Kleb.).

2.3.1. Historia, distribución geográfica e importancia económica.

Las Verticilosis son enfermedades que causan marchiteces vasculares siendo uno de los tipos de enfermedades que producen mayores pérdidas económicas en una gran cantidad de cultivos herbáceos y leñosos en la mayoría de las zonas de clima templado de todo el mundo, aunque también han sido descritas en áreas tropicales y subtropicales (Snyder y Smith, 1981; Pegg y Brady, 2002). Uno de los cultivos leñosos más afectados lo constituye el olivo, particularmente en los países de la Zona Mediterránea (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012; Mercado-Blanco y López-Escudero, 2012).

La Verticilosis del olivo (VO), causada por *Verticillium dahliae* Kleb., fue diagnosticada por primera vez en Italia (Ruggieri, 1946) y más tarde en la mayoría de los países productores de aceite de oliva y aceituna de mesa, incluyendo Argelia (Bellahcene, 2000), Australia (Morschel, 1961), Chipre (Papazolomontos, 1969), EE.UU. (Snyder *et al.*, 1950), Francia (Vigoroux, 1975), Grecia (Zachos, 1963), Israel (Tsrer y Levin, 2003), Marruecos (Serrhini y Zeroual, 1995), Siria (Al-Ahmad y Mosli, 1993), Turquía (Saydan y Copcu, 1972), y otros países de la Zona Mediterránea. La enfermedad se diagnosticó por primera vez en España en 1975 (Caballero *et al.*, 1980), en una parcela experimental de las instalaciones del actual IFAPA, Alameda del Obispo, Córdoba.

Esta enfermedad está considerada como la más importante de este cultivo por la elevada mortalidad de árboles productivos que ocasiona, siendo además la que más preocupa al olivicultor por la severidad de sus ataques, su distribución y extensión en los últimos años y las dificultades que presenta su control (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012; Mercado-Blanco y López-Escudero, 2012). No se tienen datos concretos de las pérdidas de rendimiento y producción ocasionadas por la VO en España, aunque existen algunos datos de otros países de la Cuenca Mediterránea. Así, en inspecciones realizadas en Grecia durante 1974-76 en plantaciones de olivar de las variedades susceptibles Konservolia y Kalamon se estimaron pérdidas de cosecha en un 1% de la producción total del país, con una incidencia de enfermedad de 1-7% de los árboles evaluados (Thanassouloupoulos *et al.*, 1979). En Siria, Al-Ahmad y Mosli (1993) observaron incidencias del 0,85-1%, con pérdidas estimadas de la producción total de 1-2,3%. Asimismo, Levin *et al.* (2003b) indicaron en olivares en regadío en Israel pérdidas del 75-89% en la producción en plantaciones de Picual.

En España se cuenta con datos de varias prospecciones realizadas desde los años 80 hasta la actualidad, que revelan el importante incremento de la enfermedad en este período en las zonas de mayor producción, como Andalucía. En inspecciones sistemáticas llevadas a cabo en los años 1980-83, el 38,5% de 122 plantaciones de menos de 15 años padecía esta enfermedad, con una incidencia de hasta el 90% en algunas plantaciones, aunque usualmente los porcentajes eran inferiores al 10% (Blanco-López *et al.*, 1984). Años después, la VO se ha extendido considerablemente, debido fundamentalmente a que las nuevas plantaciones intensivas en regadío se establecieron en zonas anteriormente cultivadas con huéspedes del agente, que se hallaban infestados con elevados niveles de inóculo. Además, se emplearon

variedades de olivo susceptibles y se han llevado a cabo reiteradamente prácticas culturales que favorecen la dispersión y el incremento de las estructuras infectivas del patógeno. Prueba de esta expansión en los últimos años es que la enfermedad, que no fue detectada en la provincia de Cádiz en las prospecciones realizadas por Blanco-López *et al.* (1984), ha alcanzado actualmente una gran relevancia, habiéndose observado en el 43% de los campos prospectados al azar una incidencia media del 1,05% de olivos afectados en la Comarca de la Sierra de Cádiz (León-Gallego, 2000).

En 2009, la Red de Alerta e Información Fitosanitaria de Andalucía estimaron una incidencia media del 0,45 de olivos afectados, pero en este estudio existían importantes diferencias entre comarcas olivareras, con medias en algunas de ellas de más del 9% de olivos afectados (Ruiz Torres, 2010). Las prospecciones sistemáticas más recientes corresponden a las realizadas en 90 olivares afectados por la VO en el Valle del Guadalquivir (Jaén, Córdoba y Sevilla), en las que se estimó una incidencia media del 20,4% de los 9.000 olivos inspeccionados (López Escudero *et al.*, 2010).

2.3.2. Síntomas y diagnóstico.

Blanco-López *et al.* (1984) describieron los síntomas de la enfermedad cuando ésta fue observada por primera vez en Andalucía. Los síntomas consistían en necrosis de brotes y ramas con o sin defoliación que solían afectar a la planta de forma sectorial, en el caso de árboles adultos, o completa, si eran jóvenes. Estos síntomas se suelen agrupar en dos síndromes o complejos sintomatológicos denominados apoplejía y decaimiento lento, diferenciándose por la rapidez de su evolución. La apoplejía comprende la muerte regresiva, rápida y extensa de los brotes y ramas de la planta, al mismo tiempo que las hojas adquieren un color pajizo y sufren un abarquillamiento hacia el envés, permaneciendo generalmente adheridas a las ramas afectadas (Figura 4 A). Este síndrome puede ocasionar la muerte del árbol. Por su parte, el decaimiento lento consiste en la necrosis de inflorescencias (Figura 4, B) y en el momificado de flores y frutos, que generalmente permanecen adheridos a las ramas. Otro de los síntomas característicos es la defoliación de hojas de los brotes y ramas, que previamente adquieren un color verde mate, y que en ocasiones es muy brusca y copiosa (Figura 4 C). A veces aparece una coloración violácea-púrpura en la corteza de las ramas afectadas, así como una coloración marrón oscura en los tejidos vasculares (Figura 4 D),

pudiendo aparecer estos síntomas durante el desarrollo de cualquiera de los dos síndromes. Es muy poco frecuente que se produzca la muerte de la raíz del árbol, por lo que es habitual que el olivo afectado rebrote normalmente y en años sucesivos manifieste de nuevo la enfermedad.

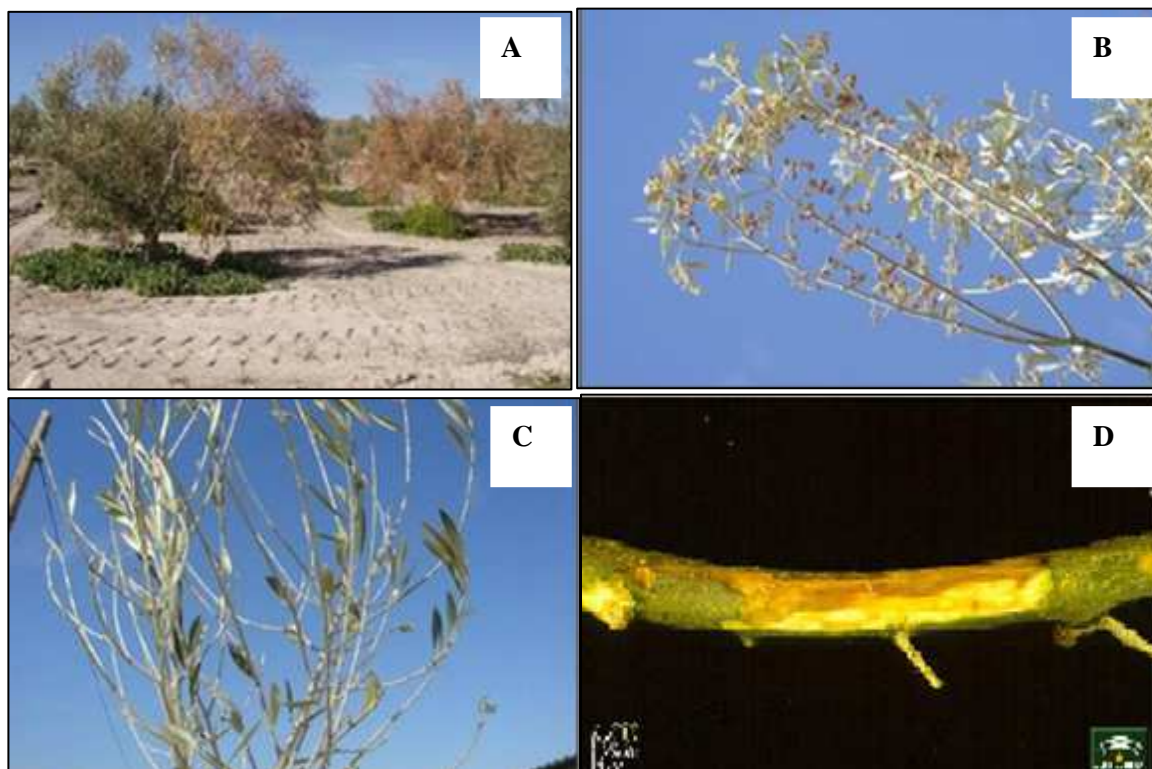


Figura 4. Síntomas de Verticilosis en el olivo [Apoplejía (A), necrosis de la inflorescencia (B), defoliación intensa de hojas verdes de los brotes y ramas (C) y coloración vascular (D)].

2.3.3. Etiología y gama de huéspedes.

El agente causal de la Verticilosis del olivo, *Verticillium dahliae* (Klebahn, 1913) (Ascomycota; Sordariomycetes; Phyllachorales), es un típico habitante de suelo (Bárbara y Clewes, 2003; Pegg y Brady, 2002; Fradin y Thomma, 2006; Klosterman *et al.*, 2009). Se caracteriza morfológicamente por la presencia de conidióforos hialinos que acaban en una serie de ramificaciones con un patrón verticilado, que portan de 3 a 4 fiálidas en cada nudo. Las fiálidas varían en tamaño (de $16-35 \times 1-2,5 \mu\text{m}$) y en sus ápices se forman conidios sexuales uniseptados, con un tamaño comprendido entre $3,0$ a $5,5 \times 1,5$ a $2,0 \mu\text{m}$ (Smith, 1965; Schnathorst, 1981; Hiemstra, 1998; López Escudero *et al.*, 2003).

Además, este patógeno produce estructuras de supervivencia denominadas microesclerocios, compuestas por agrupaciones de células melanizadas que contienen sustancias de reserva. Estos propágulos son también las estructuras de infección y dispersión de *V. dahliae* en el suelo. La forma y tamaño de los microesclerocios es variable y la relación entre los dos parámetros está correlacionada con la virulencia del aislado. Así, los aislados más virulentos producen microesclerocios más alargados que los aislados de menor virulencia, estando la relación longitud/anchura comprendida entre 5,3 y 1,4 según los estudios de López-Escudero y Blanco-López (2005c) y López-Escudero *et al.* (2012). Las dimensiones de los microesclerocios producidos por dos aislados tipo de *V. dahliae*, uno defoliante (altamente virulento) y otro no defoliante (moderadamente virulento), incluidos como controles en estas investigaciones, fueron de 64,6×19,5µm y 44,6×17,8µm, respectivamente.

Verticillium dahliae se considera una de las especies más importantes dentro del género *Verticillium*, debido a su amplia distribución y su elevado número de plantas huéspedes. Este patógeno provoca la marchitez vascular en muchas plantas herbáceas de gran importancia económica y malas hierbas, además de muchas especies leñosas cultivadas y árboles forestales, pertenecientes en su gran mayoría a la clase dicotiledóneas (Thanassouloupoulos *et al.*, 1981; Sinclair *et al.*, 1987; Vargas-Machuca *et al.*, 1987; Hiemstra y Harris, 1998; Pegg y Brady, 2002; Yildiz *et al.*, 2009).

Por otra parte, es importante destacar la variabilidad patogénica presente en las poblaciones del hongo. En algodón y olivo se han identificado aislados de *V. dahliae* conocidos como defoliantes (causan defoliación y muerte en variedades resistentes y susceptibles) y no defoliantes (causan muerte sin defoliación o defoliación ligera en variedades susceptibles y síntomas ligeros en los resistentes) (Schnathorst y Mathre, 1966a,b). Así, los aislados defoliantes resultan más virulentos que los no defoliantes y producen más enfermedad y en menor tiempo que los no defoliantes (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). En la principal zona olivarera mundial, existen ambas poblaciones de aislados en las áreas del cultivo del algodón y del olivo, aunque el aislado defoliante, que en los años 80 estaba localizado en las Marismas del Guadalquivir, está siendo observado cada vez más frecuentemente en las plantaciones del olivar, siendo incluso en muchos casos el aislado

predominante en el suelo (López-Escudero y Blanco-López, 2001; Trapero-Casas y Blanco-López, 2010; López-Escudero *et al.*, 2010; Trapero *et al.*, 2012a).

2.3.4. Ciclo de patogénesis.

Verticillium dahliae es un patógeno monocíclico. Su ciclo de patogénesis comprende las etapas de supervivencia y dispersión del inóculo, germinación de las estructuras de supervivencia, penetración del patógeno en la planta, colonización del sistema vascular, desarrollo de síntomas y producción de nuevo inóculo (Figura 5).

El patógeno sobrevive en el suelo en forma de microesclerocios liberados de los restos de plantas infectadas al final del ciclo de patogénesis. Las fuentes de inóculo disponibles para su supervivencia y posterior dispersión comprenden las partículas de suelo y de restos vegetales de huéspedes principales o alternativos, las semillas y flores infectadas y el material vegetativo de propagación. En estas fuentes de inóculo, particularmente en el suelo, el patógeno puede sobrevivir un elevado número de años.



Figura 5. Ciclo de patogénesis de *Verticillium dahliae* en huéspedes leñosos (adaptado de Hiemstra y Harris, 1998).

Otra de las principales formas de supervivencia es de forma activa, ya que, como se ha mencionado, *V. dahliae* es capaz de infectar un gran cantidad de especies herbáceas, entre ellas malas hierbas, entre las que se hallan muchas de las más comunes de las plantaciones de olivar en el Área Mediterránea.

Los microesclerocios germinan en el suelo por el estímulo de exudados de las raíces, siendo mayor cuando éstos provienen de plantas huéspedes, debido principalmente a diferencias en la concentración de las sustancias inductoras (Schreiber y Green, 1963). A continuación ocurre la penetración de las hifas al interior de la raíces, generalmente por puntos de emergencia de raíces laterales o directamente por heridas causadas por nematodos (Pierce y Gibbs, 1981) o prácticas culturales (Schnarhorst, 1981; Mol y Termorshuizen, 1995).

La penetración por el patógeno tiene lugar principalmente en la proximidad del ápice de la raíz o en la epidermis de la zona de elongación y maduración de ésta, y ocurre a través de la epidermis y el córtex mediante crecimiento intra e intercelular (Garber y Houston, 1966;

Born, 1974). Además, el modo de penetración de *V. dahliae* en las células epidérmicas o corticales parece tener lugar principalmente de forma mecánica (Garber y Houston, 1966; Born, 1974), con la formación de estructuras similares a apresorios. El patógeno coloniza la raíz dirigiéndose al xilema de sus huéspedes mediante crecimiento micelial (Selman y Buckley, 1959; Garber y Houston, 1966; Bishop y Cooper, 1983). Una vez allí, el micelio forma conidios en conidióforos simples o mediante autoconidiogénesis (Schnathorst, 1981), y los conidios quedan libres en suspensión en la savia del huésped. De esta manera, son transportadas por la corriente xilemática en sentido ascendente hacia los brotes superiores de la planta. Las placas de perforación que comunican los elementos traqueales constituyen una barrera física a su movimiento, acumulándose en estas zonas de los vasos (Beckman, 1987). Estos conidios pueden germinar produciendo hifas que atraviesan los poros de las placas de perforación o los de las paredes laterales a través de las punteaduras que comunican los vasos adyacentes, produciendo nuevos conidios, quedando el xilema colonizado longitudinal y transversalmente (Bishop y Cooper, 1983; Rodríguez-Jurado, 1993).

Cuando los síntomas alcanzan cierta severidad comienza la formación de microesclerocios, primero en el xilema y después en el resto de los tejidos (Trapero-Casas y Blanco-López, 2010). El parénquima radial también es colonizado intensamente por los microesclerocios, pudiendo ser ésta la vía de salida del hongo del sistema vascular. Los tejidos senescentes en los que se han formado los microesclerocios finalmente caen al suelo, por ejemplo tras la defoliación de hojas verdes o la necrosis de parte de los brotes, y así se cierra el ciclo.

2.3.5. Epidemiología: factores influyen en el desarrollo de la Verticilosis del olivo.

Existen una serie de factores clave que influyen en la infección, la distribución y la extensión de la Verticilosis del olivo. Los podemos reunir en los dos grupos siguientes: 1) Aquellos factores que favorecen la persistencia, la dispersión y el aumento de los propágulos infectivos del patógeno; y 2) Los que favorecen la incidencia, el progreso y la severidad de la enfermedad, agronómicos y ambientales básicamente.

2.3.5.1. Factores que favorecen la persistencia, la dispersión y el aumento de los propágulos infectivos (microesclerocios) de *Verticillium dahliae*.

El cultivo previo de especies huéspedes de *V. dahliae* en suelos en los que se van a establecer plantaciones de olivar es una de las principales causas de la aparición de la VO (Zachos, 1963; Wilhelm y Taylor, 1965; Cirulli y Montemurro, 1976; Thanassouloupoulos *et al.*, 1979; Blanco-López *et al.*, 1984; Al-Ahmad y Mosli, 1993; Serrini y Zeroual, 1995). Esto ocurre porque muchos de estos cultivos como algodón, patata, tomate alfalfa aumentan de forma muy eficiente la población del patógeno en el suelo (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1966; Pegg, 1974; Tjamos y Botseas, 1987; Tjamos y Tsougriani, 1990). Otro aspecto fundamental es que existe patogenicidad cruzada entre los aislados de olivo y de otros huéspedes (Saydan y Copcu, 1972; Cirulli y Montemurro, 1976). Así que *V. dahliae* es un hongo poco especializado en cuanto a la capacidad de causar infección en diversas especies por lo que suelos infestados previamente por inóculo generado por otros cultivos pueden ocasionar elevadas incidencias en plantaciones establecidas posteriormente o en plantaciones vecinas ya establecidas.

Las infecciones de las plantas se hallan además muy favorecidas por la elevada supervivencia del patógeno en forma de microesclerocios, que se incorporan al suelo al final del ciclo de patogénesis junto con los restos vegetales infectados del cultivo u hojas defoliadas (Wilhelm y Taylor, 1965; Evans *et al.*, 1966; Tjamos y Botseas, 1987; Tjamos y Tsougriani, 1990). Estas estructuras pueden persistir en el suelo durante un elevado número de años (Wilhelm, 1955) manteniendo su capacidad infectiva incluso en ausencia de huéspedes a los que infectar. Así mismo, el patógeno puede sobrevivir o incluso multiplicarse en el suelo colonizando malas hierbas dicotiledóneas (Skadow, 1969; Evans, 1971; McKeen y Thorpe, 1973; Busch *et al.*, 1978; Vargas-Machuca *et al.*, 1987), o leguminosas o cereales de las rotaciones de cultivos (Skipp *et al.*, 1986; Mathre, 1986 y 1989; Celetti *et al.*, 1990; Krikun y Bernier, 1990). En relación con esto, muchos géneros de malas hierbas de hoja ancha susceptibles se encuentran con frecuencia en los olivares (*Anagallis*, *Lamium*, *Malva*, *Matricaria*, *Medicago*, *Senecio*, *Solanum*, *Veronica*, etc) (Thanassouloupoulos *et al.*, 1981; Vargas-Machuca *et al.*, 1987; Heale, 1988; Ligoixakis *et al.*, 2002; Uremis, 2005; Yildiz *et al.*, 2009). Además, *V. dahliae* coloniza el sistema radical de las monocotiledóneas, tanto cultivadas como malas hierbas (Benson y Ashworth, 1976; Levy y Isaac, 1976).

Se han descrito numerosos factores involucrados en la dispersión de *V. dahliae*, algunos de los cuales podrían explicar en parte la rapidez y extensión de la (VO) en las principales zonas oliveras. Entre ellos, el uso de material de plantación infectado: injertos, yemas, brotes, estaquillas o cualquier parte de la planta infectada (Thanassouloupoulos, 1993) es una de las principales vías de dispersión. A este hecho hay que sumar el uso de suelo o agua infestados en algunas de las fases de la multiplicación de este material, que puede dar lugar a la distribución de plantas infectadas por el hongo. En la actualidad se está intentado frenar la dispersión por esta vía en los principales países productores, a través de reglamentos técnicos europeos y nacionales de control y certificación de plantas de olivo de vivero, promoviendo la producción de plantas certificadas libres de varios patógenos, en los que se hace especial mención a *V. dahliae* (Anónimo, 1999).

En cualquier caso, existen cada vez más evidencias de la importancia de la dispersión a corta y larga distancia de gran cantidad de métodos que han permitido que las estructuras infectivas de *V. dahliae* alcancen suelos de zonas anteriormente libres del patógeno. Así, los microesclerocios pueden trasladarse dentro y entre plantaciones asociados al movimiento de suelo infestado por el viento (Easton *et al.*, 1969), el transporte de restos de cultivos afectados a áreas libres (Schnathorst y Sibbet, 1971), o el uso de la maquinaria (discos o cultivadores para las labores del suelo) (Al-Ahmad y Mosli, 1993; Serrhini y Zeroual, 1995), que podrían causar daños en la raíz y facilitar las infecciones radiculares por el patógeno (Tjamos, 1993). Igualmente, la dispersión del patógeno ocurre en restos de tejidos, especialmente hojas (Wilhelm y Taylor, 1965; Tjamos y Botseas, 1987; Tjamos y Tsougriani, 1990), o flores de plantas infectadas (Trapero *et al.*, 2011); o por determinadas prácticas culturales, como el uso de estiércol animal infestado como enmienda orgánica en plantaciones de olivo (López-Escudero y Blanco-López, 1999).

El agua utilizada para el riego puede ser una importante vía de dispersión de *V. dahliae* al transportar partículas de suelo y de restos vegetales infestados. Este hecho ha sido demostrado en numerosos cultivos como patata regados por surcos o inundación (Easton *et al.*, 1969; Thanassouloupoulos *et al.*, 1981), o coliflor (Xiao *et al.*, 1998). Estos autores indicaron que también el agua de escorrentía aparecida tras unas lluvias intensas, o tras un riego copioso, podía ser una vía de dispersión para el patógeno. En olivo, este hecho se demostró inicialmente con evidencias de tipo indirecto. Así, en plantaciones de olivar la

densidad de inóculo de *V. dahliae* detectada en la zona del suelo humedecida alrededor de los goteros y su incremento con el tiempo fue significativamente mayor que la encontrada en zonas de suelo fuera de la influencia de la humedad (López-Escudero y Blanco-López, 2005b). Recientes investigaciones han mostrado evidencias directas de la dispersión de las estructuras infectivas del patógeno a través del agua de riego Así, García-Cabello *et al.* (2012) detectaron reiteradamente propágulos infectivos en las principales infraestructuras de estaciones de bombeo de comunidades de Regantes (canales principales, tanques de recepción de estaciones) y en aquellas que el agricultor emplea a nivel de explotación particular (filtros de arena, balsas para riego, etc). Finalmente, estos propágulos también llegaban a liberarse en el suelo a través de los sistemas de riego por goteo empleados en las plantaciones de olivar investigadas (García-Cabello *et al.*, 2012). Asimismo, Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar (2007) han demostrado la presencia de estructuras infectivas del patógeno en aguas de riego y pozos de explotaciones olivareras en Andalucía.

Por otra parte, hay numerosas especies de hongos fitopatógenos que causan diferentes enfermedades en huéspedes leñosos, que pueden transmitirse eficientemente mediante insectos xilófagos del tipo del barrenillo del olivo (Webber y Gibbs, 1989). De todas formas, sólo hay pocos casos directamente asociados mediante evidencias científicas con las enfermedades vasculares. El ejemplo más representativo de una enfermedad vascular transmitida por un escarabajo escolítido trasmisor, sin querer apuntar a un paralelismo con el caso de una hipotética transmisión de *V. dahliae* mediante insectos similares, es la enfermedad del olmo holandés, causada por *Ophiostoma ulmi*, que es transmitido por *Scolytus* spp. (Webber, 2004). Los adultos de este escolítido transportan los conidios del patógeno adheridos a sus cuerpos cuando abandonan las galerías practicadas en los olmos enfermos buscando olmos sanos para hacer en ellos sus galerías de alimentación. En cualquier caso, es bien sabido que ésta no es una simple transmisión, sino una relación mutualista entre el escarabajo y el patógeno, lo cual no ocurre en el caso de *V. dahliae* y otros insectos de este grupo.

En relación a la posible dispersión y transmisión de *V. dahliae* mediante insectos, la información actual disponible es muy escasa. Una de las excepciones es la alfalfa, en la cual ciertos insectos como el áfido del guisante (*Acyrtosiphon pisum*), el gorgojo de la alfalfa (*Hypera postica*), los saltamontes migratorios (*Melanoplus sanguinipes* y *M. bivittatus*), y la

abeja cortadora de hojas (*Megachile rotundata*) pueden servir de vectores para una transmisión efectiva del patógeno *V. alboatrum*, especie muy cercana a *V. dahliae* (Huang, 2003). En especies leñosas sólo hay descritos algunos casos de transmisión. Por ejemplo, Popushoi y Kulik (1976) señalaron que *V. dahliae*, causante de la Verticilosis de albaricoque, podría transmitirse por el escarabajo de la corteza de fruta *Scolytus rugulosus*. Son también interesantes los resultados de Tiberi y Ragazzi (1998) en el que se demuestra la transmisión de *V. dahliae* sobre los vectores insectos xilófagos *Scolytus intricatus* (Ratz.) y *Xyleborus dispar* (F.) durante los estudios dirigidos a determinar las causas del decaimiento de los robles en Italia. En cualquier caso, este género de árboles comprende especies que no son huéspedes comunes de *V. dahliae*.

2.3.5.2. Factores que favorecen la incidencia, el progreso y la severidad de la enfermedad.

Factores agronómicos: riego, fertilización, densidad de árboles y manejo del suelo.

La VO es particularmente severa en plantaciones en regadío en gran cantidad de huéspedes (Ruggieri, 1948; Cirulli, 1981; Schnathorst, 1981; Pegg y Brady, 2002). Sin embargo, en algunos casos esta observación es contradictoria (Xiao y Subbarao, 2000). La transformación de olivares de secano a regadío que se ha experimentado en Andalucía los últimos años ha podido contribuir a la expansión de la VO a zonas donde la enfermedad no había sido antes observada, o constituía un problema menor (Dervis *et al.*, 2010). Aunque en este momento hay varios proyectos de investigación, financiados por diversos organismos públicos y privados, que intentan esclarecer la influencia del riego en el desarrollo de la enfermedad, la hipótesis común de partida es que el avance de la VO ha sido particularmente importante cuando ha ocurrido la transformación mencionada, o bien, en zonas ya en riego, se han aumentado las dosis o frecuencias de éste. El efecto de riego en la aparición y desarrollo de la VO se ha descrito en numerosos países de la Cuenca Mediterránea. Por ejemplo, los valores de incidencia de la enfermedad en plantaciones de secano y regadío alcanzaron, respectivamente, 9% y 21% en Marruecos (Al-Ahmad y Mosli, 1993); 4,5 y 13% en Siria (Serrhini y Zeroual, 1995); 17 y 40% en el sur de España (Blanco-López *et al.*, 1984); y en las prospecciones más recientes, 18,3 y 20,3% en las tres provincias productoras más importantes del Valle del Guadalquivir, en Andalucía (López-Escudero *et al.*, 2010).

En relación a la influencia de la fertilización sobre las enfermedades vasculares, ésta ha sido estudiada en numerosos cultivos (Pegg y Brady, 2002; Datnoff *et al.*, 2007; Huber y Thompson, 2007). Sin embargo, la mayoría de la información disponible sobre este tema está relacionada con plantas herbáceas, y se sabe poco acerca de las especies leñosas, incluyendo al olivo. La nutrición, en particular la fertilización nitrogenada inadecuada, influye sobre el crecimiento de plantas y sus mecanismos de defensa contra los ataques de agentes patógenos (Datnoff *et al.*, 2007). En las Verticilosis en general, la reducción de la fertilización nitrogenada reduce la incidencia y severidad de la enfermedad (Pegg y Brady, 2002). En el caso del olivo, se asume que un exceso de este tipo de fertilización, particularmente combinada con un exceso de riego, conduce a rápidos crecimientos vegetativos que pueden incrementar la incidencia y la severidad en las plantaciones afectadas por VO. En cualquier caso, son necesarios estudios más profundos que clarifiquen la influencia de la fertilización en la enfermedad y sus complejas relaciones con los demás factores ambientales y agronómicos.

La influencia de la densidad de árboles sobre la incidencia de la VO está siendo considerada en la actualidad como un posible factor influyente en el incremento de la incidencia y severidad en el olivar. Estas observaciones, que provienen de técnicos y de agricultores, se refieren principalmente a las plantaciones de alta densidad y los cultivos en seto (superintensivos). Sin embargo, en estudios realizados los últimos años en los que se ha evaluado esta posible influencia; los resultados han demostrado que la densidad de los árboles parece no influir en el desarrollo de la enfermedad (López-Escudero *et al.*, 2009).

También las prácticas de laboreo parecen tener un efecto importante en la dispersión de VO en cultivos herbáceos y leñosos (Hiemstra y Harris, 1998; Pegg y Brady, 2002). Algunos autores han sugerido en cultivos de algodón y olivo que las heridas provocadas en las raíces por el laboreo podrían facilitar la infección por *V. dahliae* (Schnathorst y Mathre, 1966a,b; Tjamos, 1993). En los últimos años, el uso de sistemas de manejo del suelo en olivar basados en el establecimiento de cubiertas vegetales vivas o inertes es cada vez más generalizado. Las cubiertas vegetales con especies no susceptibles protegen el suelo de la degradación o la erosión al que se ve sometido por el agua de la lluvia y el viento; incrementan la materia orgánica y la retención del agua en el suelo; y conllevan la reducción del laboreo. Esta práctica cultural podría ejercer una influencia significativa sobre el desarrollo de las epidemias de VO. De hecho, cuando se emplean cubiertas vivas naturales se

suele fomentar el crecimiento de numerosas especies de hoja ancha que podrían actuar como huéspedes alternativos de *V. dahliae* y contribuir, de este modo, a la supervivencia e incremento del inóculo del hongo en plantaciones de olivar (Bejarano-Alcázar, 2008; López-Escudero *et al.*, 2008).

Factores ambientales: temperatura, humedad, características edáficas y interacciones bióticas.

La temperatura del suelo y el aire influyen en la aparición de síntomas y el desarrollo de la infección causada por *V. dahliae* en algunos huéspedes del patógeno. La temperatura óptima para *V. dahliae* está comprendida entre 22 y 25°C, que coincide con la temperatura más favorable para el desarrollo de muchas especies pertenecientes al género *Verticillium* (Wilhelm y Taylor, 1965; Garber y Presley, 1971; Pegg y Brady, 2002). Además, la severidad de los ataques de VO se ve favorecida por las temperaturas del aire comprendidas entre 20 y 25°C durante la primavera, y por temperaturas diarias no superiores a 30-35°C durante el verano (Wilhelm y Taylor, 1965; López-Escudero y Blanco-López, 2001). Sin embargo, las temperaturas por encima de 25°C durante un período prolongado de tiempo en el verano pueden inhibir el desarrollo de los síntomas de VO.

Por otra parte, se sabe poco acerca de la influencia de los factores edáficos sobre la presencia y aumento del inóculo de *V. dahliae* en el suelo (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). Como ejemplo, se han estudiado los efectos de las modificaciones del pH del suelo producido por la descomposición de la materia orgánica en el control de VO en varios huéspedes herbáceos. En estos trabajos se ha observado que la presencia de *V. dahliae* en suelos neutros y alcalinos (pH 6-9) era común, mientras que los suelos con el pH ácido (por debajo de 5,5) inhibían su crecimiento y la producción y supervivencia de los microesclerocios (Lazarovits *et al.*, 2000; Pegg y Brady, 2002; Goicoechea, 2009). Así mismo, varios estudios indican que los suelos salinos o la práctica de riego con aguas residuales ricas en sal aumentan la incidencia y la severidad de la marchitez vascular en cultivos como la patata, tomate, alfalfa y arce de azúcar (Pegg y Brady, 2002). En otros estudios realizados en olivo en Israel se demostró que árboles de las variedades Barnea, Picual y Souri que crecían en un suelo franco-arenoso con un alto contenido de sal (Na^+ : 250-440 Meq, Ca^{++} y Mg^{++} : 40-180 Meq; B: 0.0-10 mg l⁻¹) y regados con agua salina con una

concentración de sal de $4,2 \text{ dS m}^{-1}$, presentaron una alta incidencia de VO (Levin *et al.*, 2003a,b y 2007).

Por último, en el desarrollo de las Verticilosis se deben tener en cuenta las interacciones entre *V. dahliae* y otros microorganismos de suelo. En el caso del olivo, uno de los factores más importantes a considerar es la interacción entre *V. dahliae* y los oomicetos *Phytophthora megasperma* y *P. inundata*, causantes de la podredumbre radical del olivo (Sánchez Hernández *et al.*, 1997, 1998a,b y 2001). Ambas especies se encuentran con frecuencia en los suelos y sus infecciones están asociadas a condiciones de encharcamiento o riego excesivo. Los autores mencionados observaron un aumento importante en la podredumbre radical y la VO en plantaciones de olivo jóvenes, que podrían indicar una cierta interacción entre ambos organismos del tipo sinergismo o predisposición. De hecho, los dos patógenos, *Phytophthora spp.* y *V. dahliae*, pueden sobrevivir juntos en el suelo en forma de estructuras de resistencia (oosporas y microesclerocios, respectivamente), y pueden infectar el mismo árbol al mismo tiempo en condiciones favorables (Sánchez-Hernández *et al.*, 1998a; Sánchez-Alcalá, 2005). Se especula incluso que las posibles infecciones causadas por el patógeno *Phytophthora spp.* en variedades del olivo resistentes a *V. dahliae* podrían modificar el nivel de resistencia de las mismas, aumentando su susceptibilidad a VO o incluso romper su resistencia a *V. dahliae*.

Otro grupo de microorganismos que se ha considerado en el tipo de interacciones descritas es el de los nematodos. Uno de los ejemplos es el de *Meloidogine javanica*, un fitoparásito que se encuentra en el suelo y que puede causar daños considerables a los olivares en las zonas donde *V. dahliae* también está presente (Saeedizadeh *et al.*, 2003 y 2006). En un estudio realizado en invernadero, Saeedizadeh *et al.* (2003) demostraron que las plantas inoculadas con *V. dahliae* y *M. javanica* presentaban una reducción significativa en el crecimiento en comparación con las plantas inoculadas con cada uno de ellos por separado.

2.3.6. Medidas de lucha.

La Verticilosis del olivo presenta grandes dificultades para su control, derivadas fundamentalmente de las características del ciclo del patógeno. Como ya se ha mencionado, los microsclerocios que produce *V. dahliae* pueden sobrevivir en el suelo en ausencia de

huésped durante periodos prolongados de tiempo; su actividad infectiva, desarrollada en el interior de los haces xilemáticos lo hacen inaccesible; y por último, la presencia de una amplia gama de huéspedes alternativos, especies cultivadas y malas hierbas, contribuyen al mantenimiento y aumento de su población en el suelo en ausencia del huésped principal (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). En huéspedes leñosos, como el olivo, habría que sumar el hecho de que éstos se establecen en el terreno por periodos de tiempo prolongados, sobre suelos infestados *a priori*, o en los que el patógeno puede introducirse después de la plantación. Estos aspectos hacen que las medidas de control de la VO deban estar incluidas en un marco de lucha integrada, a través de métodos de aplicación conjunta llevados a cabo antes, durante y después de la plantación (Blanco-López y Jiménez-Díaz, 1995; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

Exclusión.

Las medidas de exclusión tienen como objetivo evitar la llegada del patógeno a zonas donde no está establecido, o bien en las que está presente pero con escasa densidad de inóculo. Estos métodos consisten en la utilización de suelos no infestados para la plantación, y el empleo de material no infestado.

La elección de suelos no infestados debe basarse inicialmente en la recogida de información acerca de las rotaciones de cultivos susceptibles practicadas con anterioridad en la parcela (Blanco-López y Jiménez-Díaz, 1995; López-Escudero *et al.*, 2003). Si la historia de cultivos indica la posible presencia del patógeno en el suelo de la parcela por el cultivo previo de huéspedes susceptibles, es conveniente realizar un análisis fitopatológico del suelo para determinar la densidad de inóculo del hongo (López-Escudero *et al.*, 2003). Investigaciones posteriores han mostrado que el cultivar Picual puede ser susceptible incluso a cantidades muy bajas del aislado defoliante del patógeno en el suelo y que a niveles superiores la incidencia de plantas enfermas puede dispararse (López-Escudero y Blanco-López, 2007). Así, no se observaron diferencias en la incidencia final de enfermedad, después de un periodo de más de dos años y medio de observaciones, entre microparcels infestadas con una densidad de inóculo comprendida entre 0,04 y 1,0 microesclerocios por gramo de suelo, alcanzando un valor medio final del 11,0% de árboles afectados. Sin embargo, en los tratamientos infestados con 3,0 o 10,0 microesclerocios por gramo de suelo, el porcentaje de

árboles con marchitez fue significativamente mayor, alcanzando una media del 55,5%, lo que sugería que la resistencia en Picual era superada cuando la cantidad de microesclerocios en el suelo era superior a un umbral de 1,0 por gramo (López-Escudero y Blanco-Lopez, 2007).

Existe un gran riesgo de introducción del patógeno en zonas que anteriormente estaban libres de éste por el uso de material de propagación como semillas, esquejes, estaquillas, etc., siendo esto especialmente importante en ambiente controlado y en zonas libres de patógeno. En el caso del olivo, esto ocurre en ocasiones porque la propagación del material vegetal (estaquillas enraizadas bajo nebulización) se ha realizado a partir de plantas madre que pueden presentar infecciones de tipo asintomático (Cirulli y Montemurro, 1976; Thanassouloupoulos, 1993). El establecimiento de programas de inspección y certificación en los viveros ha favorecido la reducción de las infecciones por este motivo.

Tras la plantación se deben tomar otra serie de medidas excluyentes, como evitar cultivos intercalares con plantas susceptibles, limitar el acceso a parcelas no afectadas de vehículos y aperos de labranza utilizados con anterioridad en suelos infestados, no usar material vegetal infectado para el replanteo de plantas muertas o para aumentar la densidad de la plantación, y proteger la plantación de la llegada de suelo, agua de escorrentía o restos vegetales infectados por la acción del viento o facilitada por pendientes favorables (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

Erradicación.

En la actualidad no existen medidas de control que consigan la erradicación completa de las estructuras infectivas de *V. dahliae* en el suelo, aunque algunos métodos y técnicas de cultivo pueden reducir considerablemente la densidad de inóculo de éste y limitar su crecimiento. Se pueden aplicar diferentes métodos de control físicos, químicos, o culturales, o alguna combinación de éstos. La aplicación se puede realizar de forma localizada en la plantación, por ejemplo en determinados focos de árboles infectados, o en superficies más extensas.

Uno de los métodos de control físico que ha resultado más efectivo para reducir la densidad de inóculo de *V. dahliae* en el suelo es la solarización, que se ha empleado con éxito

en numerosos cultivos herbáceos (Katan, 1987) y también ha resultado muy efectivo cuando se ha aplicado en plantaciones de olivar afectadas por la VO (López-Escudero y Blanco-López, 2001; Tjamos, 1993). La solarización en las condiciones del Valle del Guadalquivir redujo el patógeno en el suelo y ralentizó el desarrollo de la enfermedad durante al menos 3 años, siendo esta reducción independiente del patotipo del hongo presente en el suelo y de la densidad de inóculo inicial (López-Escudero y Blanco-López, 2001).

Existe una amplia gama de métodos culturales que pueden contribuir a la reducción de la población del patógeno en el suelo. En suelos con una baja densidad de inóculo del patógeno, el retraso de la plantación de especies susceptibles unos años, manteniendo el suelo limpio de malas hierbas o cultivado con especies no susceptibles, puede contribuir al descenso de la población del patógeno (Pegg y Brady, 2002; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). Igualmente, la aplicación de sustratos orgánicos al suelo es un método de enorme eficacia para reducir la población de *V. dahliae* (Lazarovits *et al.*, 2000; Goicoechea, 2009). Un ejemplo es el uso de material vegetal de diversas especies de las familias Gramíneae (Poaceae) y Brassicaceae (Cruciferae) que han sido capaces de reducir la viabilidad de los microesclerocios en el suelo tras su enterrado (López-Escudero *et al.*, 2007). Esta es una reducción directa debido a que los procesos anaerobios o fermentativos de las enmiendas en verde hacen desprender sustancias fungicidas, como los isotiocianatos, que tienen capacidad de destruir los microesclerocios de *V. dahliae*. También ocurre un efecto de control biológico ya que la enmienda favorece la actividad de la flora antagonista, fundamentalmente bacteriana, presente en el suelo (Goicoechea, 2009). En el caso particular de la VO, Bejarano-Alcázar (2008) y López-Escudero *et al.* (2008) han revisado el potencial de algunas de las prácticas culturales relacionadas con la incorporación de diferentes sustratos orgánicos a los suelos en plantaciones de olivo bajo diversos sistemas de manejo de suelo.

Además, dentro de los métodos de erradicación hay que incluir aquellos que se aplican para la destrucción de la fuente de inóculo, tal como la quema de restos de material vegetal infectado provenientes de la poda de árboles afectados, como se aconseja en la VO (Blanco-López y Jiménez-Díaz, 1995).

Finalmente, el control químico aplicado en suelos desnudos se puede realizar con desinfectantes de suelo autorizados (Methan Sodio, Dazomet, etc), si bien la utilización de

estos productos tiene limitaciones por su coste, toxicidad y dificultad de aplicación (Trapero-Casas y Blanco-López, 2010). Además, se ha demostrado que la aplicación de productos químicos sólo reduce la población de *V. dahliae* en el suelo, no erradicándola completamente debido a la ubicación de las estructuras del patógeno en el suelo (Powelson *et al.*, 1993).

Escape.

Los métodos de escape reducen la eficacia del patógeno para causar enfermedad, a pesar de su presencia en el suelo. Los más importantes son: 1) Reducir el laboreo, particularmente en aquellas zonas de las parcelas que presenten mayor densidad de inóculo. Si esta información se desconoce, evitar el laboreo en las zonas en las que se observen focos de la enfermedad, por ejemplo, agrupaciones de árboles afectados por VO en plantaciones de olivo (Blanco-López y Jiménez-Díaz, 1995); 2) Evitar los riegos con dosis o frecuencias excesivas aplicados en determinados momentos susceptibles para la infección (Arbogast *et al.*, 1999; Blanco-López y Jiménez-Díaz, 1995; El-Zik, 1985); 3) Aplicar una fertilización nitrogenada equilibrada, evitando los rápidos crecimientos vegetativos; 4) Controlar las malas hierbas mediante herbicidas, particularmente las que crezcan en las zonas de goteros en las plantaciones de olivo (Blanco-López y Jiménez-Díaz, 1995; López-Escudero y Blanco-López, 2005a); y 5) Evitar cultivos intercalares en plantaciones susceptibles al agente (Blanco-López y Jiménez-Díaz, 1995).

Uso de variedades resistentes.

El empleo de variedades resistentes es el método más económico, efectivo y respetuoso con el medio ambiente para el control de la VO (Blanco-López y López-Escudero, 2005). Por ello resulta fundamental el conocimiento previo de la resistencia de las diferentes variedades de olivo a *V. dahliae*. La búsqueda y uso de fuentes de resistencia genética en olivo a la VO ha sido recientemente revisada en profundidad por Trapero *et al.* (2010), López-Escudero y Mercado-Blanco (2011) y Mercado-Blanco y López-Escudero (2012). En estas revisiones se describen los principales trabajos realizados por grupos de investigación nacionales y extranjeros en relación a la evaluación de resistencia de genotipos de olivo en condiciones de campo y mediante inoculaciones artificiales. En cualquier caso, en la presente

revisión bibliográfica sólo se recoge de forma resumida el estado actual de las investigaciones realizadas por los grupos de investigación de Andalucía.

En olivo hay disponible una fuente genética de resistencia muy amplia, lo que permite la búsqueda e identificación de individuos resistentes en las colecciones de variedades (bancos de germoplasma), en las poblaciones naturales de acebuche, en las progenies de diferentes genitores de cruzamientos y clones avanzados de los programas de mejora actualmente en curso. Los genotipos resistentes seleccionados podrían ser usados directamente como nuevas variedades, para reemplazar plantas muertas en plantaciones afectadas por la enfermedad, como patrones para las variedades de interés ya existentes, o para ser incorporados como genitores en los programas de mejora que se están desarrollando en algunos de los principales países productores.

En España, la evaluación a las infecciones por *V. dahliae* de variedades de olivo en condiciones controladas la inició el Grupo de Patología Agroforestal (AGR-216) de la Universidad de Córdoba con el estudio de los genotipos preservados en el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo del Centro Alameda del Obispo (IFAPA, Córdoba) (Caballero y del Río, 2008). En la actualidad hay más de 150 variedades evaluadas por su resistencia a la VO (López-Escudero *et al.*, 2004; Raya-Ortega, 2005; Martos-Moreno *et al.*, 2006, López-Escudero *et al.*, 2007; Birem, 2009; Abo Shkeers, 2010; García-Ruiz, 2011), de entre los cuales han sido identificados las variedades Empeltre, Frantoio, Oblonga y Changlot Real como resistentes. La mayoría del resto de las variedades evaluadas han sido susceptibles o extremadamente susceptibles a las infecciones por el patógeno, incluyendo las variedades principales españolas como Picual, Hojiblanca, Cornicabra y Arbequina. Otras variedades con moderada resistencia han sido Koroneiki y Sevillena.

Estos resultados obtenidos tras inoculaciones artificiales se han confirmado en varios experimentos de campo realizados durante los últimos años. En primer lugar se estableció en 1998 una parcela experimental en un campo con alta densidad de inóculo del patógeno con el objetivo de investigar la influencia de diferentes combinaciones patrones y variedades injertadas en la resistencia de olivo a *V. dahliae* (Martos-Moreno, 2003; López-Escudero *et al.* datos no publicados). En las plantas no injertadas de este experimento, desarrolladas sobre sus propias raíces, las variedades Cornicabra, Picual y Picudo se mostraron extremadamente

susceptibles. Sin embargo, se confirmó que en condiciones de campo Arbequina era mucho más resistente que Picual, o el resto de variedades susceptibles, y que Changlot Real, Empeltre y Frantoio desarrollados sobre sus propias raíces mantenían los niveles de resistencia encontrados en inoculaciones artificiales en condiciones controladas.

Los experimentos de campo más recientes corresponden a la colaboración que desarrolla el Grupo AGR-216 con investigadores del IFAPA (Alameda del Obispo, Córdoba) en el marco de la Red Andaluza de Experimentación Agraria. Éstos han consistido en el establecimiento de dos extensas parcelas experimentales sobre suelos altamente infestados con *V. dahliae*, en los que tras 2 años de observaciones se han confirmado los niveles de resistencia y susceptibilidad de las más importantes variedades principales españolas. Así, 20 meses después de la plantación, casi la totalidad de los árboles de Picual, Cornicabra y Manzanilla de Sevilla habían muerto, mientras que Arbequina, Koroneiki, Sevillena, Frantoio, Empeltre y Changlot Real mostraron un nivel muy elevado de resistencia, particularmente los tres últimos.

Actualmente los estudios de resistencia a la Verticilosis del olivo se hayan incorporados como un nuevo objetivo en el programa de mejora en olivo de la Universidad de Córdoba (Trapero *et al.*, 2012b). En este programa se están incluyendo individuos de acebuche, progenies de diferentes genitores de cruzamientos y clones avanzados, así como otras especies de *Olea europea*. Hasta la fecha se han evaluado más de 8.000 genotipos, de los cuales más de 500 se han seleccionado por presentar resistencia en estas condiciones experimentales y se encuentran actualmente en la fase de evaluación en campo, en parcelas con un elevado nivel de inóculo. Los genotipos evaluados se han obtenido principalmente mediante cruzamientos entre variedades, básicamente variedades principales con características agronómicas y de rendimiento y calidad de aceite muy mejoradas, y polinización libre de poblaciones silvestres y otras especies del género *Olea*, tales como *O. cuspidata* u *O. ferruginea*. La evaluación y selección de genotipos de olivo en campo probablemente proporcionará patrones o variedades resistentes a la Verticilosis en los próximos años.

Finalmente, en relación al uso de la resistencia como método de control, hay que mencionar el fenómeno de la recuperación natural. Éste ocurre habitualmente en condiciones

de campo en árboles que han expresado síntomas generalmente ligeros y temporalmente, y está asociada a la resistencia de la variedad (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). La recuperación está relacionada con mecanismos que ponen en marcha numerosas especies leñosas para superar daños y decaimientos (Shigo, 1984), y también se activa tras las infecciones causadas por patógenos vasculares como *V. dahliae* (Wilhelm y Taylor, 1965; Tjamos *et al.*, 1991; López-Escudero y Blanco-López, 2001). En olivo, la recuperación natural se ha observado en campo en plantaciones comerciales o experimentales (Wilhelm y Taylor, 1965; Vigouroux, 1975; Blanco-López *et al.*, 1990, Tjamos *et al.*, 1991; López-Escudero y Blanco-López, 2001). Asimismo, se ha evaluado y cuantificado en inoculaciones artificiales en cámara de ambiente controlado en variedades de olivo de diferente nivel de resistencia (López-Escudero y Blanco-López, 2005a). Este fenómeno sin duda puede complementar la resistencia cultivar, particularmente bajo condiciones de potencial de enfermedad bajos (densidades de inóculo bajas y aislados de baja o moderada virulencia en el suelo).

Terapia.

Una vez establecida la enfermedad en el huésped, la inaccesibilidad de los haces xilemáticos de las plantas, particularmente en huéspedes leñosos como el olivo, hace poco efectivos los tratamientos químicos de terapia. Los métodos terapéuticos aplicados a plantas mediante fungicidas sistémicos aplicados foliarmente o al suelo no han dado resultados satisfactorios (Cirulli y Montemurro, 1976; Tjamos, 1993; López-Escudero y Blanco-López, 1996). En las plantas leñosas, una causa sugerida ha sido que en el momento de desarrollo de los síntomas, la extensión de las oclusiones vasculares también impide la distribución del compuesto químico (Born, 1974). Los productos más utilizados han sido los benzimidazoles (Benomilo, Carbendazima, Tiabendazol y Metil-Tiofanato). En experimentos de control químico en campo realizados en los últimos años, también se ha observado que las aplicaciones con Carbendazima, Fosetil-Aluminio, Permanganato potásico y Stroby a través del riego por goteo en plantaciones de olivar afectadas de VO, no ocasionaban una reducción de la incidencia de árboles enfermos ni de la severidad de los síntomas foliares (Sánchez-Alcalá, 2005).

2.4. Escudete de la aceituna (*Botryosphaeria dothidea* Moug.).

2.4.1. Historia, distribución geográfica e importancia económica.

El Escudete de aceituna causada por el hongo *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) (Ascomycota: Dothideomycetes) es una micosis aérea que se encuentra muy extendida en los olivares de la Cuenca Mediterránea. En España se observó por primera vez en 1914 por González Fragoso (Phillips *et al.*, 2005; Lazzizera *et al.*, 2008).

En general esta enfermedad tiene escasa importancia excepto por su influencia en la calidad de la aceituna para el verdeo, aunque Salgues (1937) indicó que la infección por el Escudete puede reducir la producción del aceite un 3% (Hepdurgun y Onder, 1999). En un estudio realizado por González *et al.*, (2006) se demostró que no había mucha diferencia en la calidad del aceite extraído de muestras de aceitunas sanas u otras infectadas por el Escudete.

2.4.2. Sintomatología.

Los síntomas del Escudete se encuentran sólo en los frutos. Existen dos tipos de síntomas. El primero se observa en las aceitunas verdes a lo largo del verano hasta el principio de otoño y consiste en una mancha más o menos redonda de color pardo, con diámetro entre 3 y 6mm, deprimida en el centro y de borde ligeramente elevado. El segundo síndrome se produce durante las estaciones de otoño e invierno, y consiste en una podredumbre general y momificado de las aceitunas maduras debido al descenso del contenido en agua de las mismas, lo que puede provocar también la caída prematura del fruto.

En condiciones favorables de humedad relativa alta, la superficie del fruto afectado se cubre con un micelio blanquecino y cuerpos pequeños de color oscuro (picnidios, fructificación asexual) visibles a simple vista.

2.4.3. Agente causal: taxonomía, características generales.

El agente causante del Escudete fue identificado por Von Thumen en 1883 como *Phyllosticta dalmatica* Thum, posteriormente fue identificado como *Macrophoma dalmatica*,

Sphaeropsis dalmatica, *Camarosporium dalmaticum* o *Fusicoccum dalmaticum*. Recientemente, mediante los análisis filogenéticos utilizando técnicas moleculares, este agente se identificó como *Fusicoccum aesculi* y *Botryosphaeria dothidea* (Phillips *et al.*, 2005). Las observaciones realizadas por González y Trapero-Casas (2006) en aceitunas afectadas de Escudete en Andalucía confirmaron dicha identificación.

El hongo *B. dothidea* produce cuerpos fructíferos (picnidios) que aparecen como pequeños puntitos negros. Éstos son globosos, elípticos o ligeramente piriformes, de color negro, midiendo entre 100 y 380µm. En el interior de los picnidios se forman los conidios de los que hay dos tipos principales: alargados (cilíndrico–fusiformes) y redondeados (ovoides–piriformes–claviformes). Los conidios fusiformes son los más frecuentes y miden entre 21,2µm de longitud y 5,2µm de anchura.

Los conidios piriformes son de color marrón claro, aseptados (hasta 5 septas); se encuentran con menor frecuencia en comparación con el tipo anterior, midiendo entre 13,7µm de longitud y 6,0µm de anchura. En trabajos recientes se ha demostrado que las dimensiones de los picnidios y conidios obtenidos en medio de cultivo son distintas a las que fueron indicadas en aceitunas, aunque no hubo diferencias entre los dos tipos de conidios (González *et al.*, 2006; González y Trapero-Casas, 2006).

No se conoce la forma de reproducción sexual de *B. dothidea*, aunque en un estudio realizado por González y Trapero-Casas (2006) encontraron cuerpos inmaduros que podrían corresponderse con ascomas del estado sexual de *B. dothidea*.

2.4.4. Medidas de lucha.

Generalmente no existen medidas específicas de control para el Escudete debido a la escasa importancia de esta enfermedad. Cabe destacar que la lucha contra *B. oleae* y *P. berlesiana* es una de las medidas más eficaces contra esta enfermedad (De Laurentiis, 1993; La Greca y Vrenna, 1995). La eliminación de los frutos caídos al suelo acaba con la principal fuente de inóculo. Por último, los tratamientos fungicidas contra el Repilo limitan los ataques del patógeno, sobre todo en la fase avanzada de la enfermedad que se desarrolla durante el

otoño y provoca la podredumbre de la aceitunas (Harpaz y Gerson, 1966; Trapero-Casas y Blanco- López, 2010).

2.4.5. Factores que influyen en el desarrollo del Escudete.

El Escudete tiene la capacidad de desarrollarse en condiciones climatológicas de humedad relativa baja (entre 40 - 50%) y temperatura por encima de 30°C desde primavera a otoño en la presencia de heridas en las aceitunas. Estas condiciones en las que se desarrolla la enfermedad han llamado la atención de diversos autores, haciendo pensar en la posible implicación de agentes bióticos como vectores del patógeno. Así, se ha intentado demostrar una correlación entre los ataques de la mosca del olivo *B. oleae* y la incidencia del cecidómido *P. berlesiana*, un depredador de huevos de la misma (Verona, 1952; Harpaz y Gerson, 1966; Mateo-Sagasta, 1968; Civantos y Sánchez, 1993; Longo *et al.*, 2004).

Harpaz y Gerson (1966) señalaron que casi el 90% de las infecciones producidas en campo estaban asociadas principalmente a los daños previos causados por *B. oleae*, pues el agente causal de esta enfermedad penetra por los orificios de puesta o salida de *B. oleae*. En trabajos recientes, Iannotta *et al.*, (2007 y 2008) mantienen que existe una relación directa entre los ataques de la mosca del olivo y la dispersión del Escudete en las aceitunas. Resultados similares fueron obtenidos por Viggiani y Sasso (2008).

Esta relación fue corroborada en estudios realizados en olivares situados en la región central de Italia (Abruzzo), en los que se observó que la incidencia del Escudete alcanzaba el 40% de los frutos que estaban atacados por *B. oleae* (De Laurentiis, 1993). También en Calabria (Italia), La Greca y Vrenna (1995) observaron que los ataques del Escudete eran más frecuentes en los años en los que la presencia de mosca del olivo era alta y la dispersión del hongo *Sphaeropsis dalmatita*, causante de la enfermedad, estaba relacionada con la presencia de *B. oleae* y *P. berlesiana*.

A pesar de que muchos autores sugieren que el cecidómido *P. berlesiana* puede actuar como vector del patógeno, los datos obtenidos por González y Trapero-Casas (2006) no permiten confirmar ni rechazar la hipótesis de que el cecidómido sea vector de *C. dalmaticum*, ya que estos autores no observaron la presencia de *P. berlesiana* en el 77,5% de

aceitunas con Escudete. En estos estudios tampoco se pudo aislar al patógeno *C. dalmaticum* de larvas del cecidómido. Sin embargo, Shun *et al.* (2012) han aislado el patógeno *B. dothidea* de los huevos de la especie *Illiciomyia yukawai* (Cecidomyiidae) con una frecuencia mayor al 90%, e incluso han podido localizar sus conidios en una bolsa especializada llamada mycangia asociada al séptimo segmento de su abdomen.

2.5. El mosquito de la aceituna (*Prolasioptera berlesiana* Paoli).

Esta especie de Díptero pertenece a la familia Cecidomyiidae. Se conocen más de 5.500 especies de cecidómidos en el mundo (Gagné, 2010), de las cuales 260 especies se han citado en la península Ibérica (Carles-Tolrá, 2002). Entre ellos se encuentra *Prolasioptera berlesiana* (Paoli, 1907) conocido como el mosquito de la aceituna, muy común en la Cuenca Mediterránea (Skuhravá y Skuhavy, 1997; Hepdurgun, 1998). Fue descubierto y descrito por primera vez en el año 1907 en olivares de Perugia Italia por Paoli como *Lasioptera berlesiana*, y más tarde Kieffer en 1913 modificó su denominación a su nombre actual.

El adulto es muy pequeño (2mm de largo), con cuerpo generalmente rojizo excepto la parte dorsal del tórax, los segmentos dorsales del abdomen y las antenas son de color negro. Las antenas tienen 20 artejos siendo cada uno ligeramente más ancho y largo. Las alas son peludas, transparentes y pequeñas en proporción al cuerpo. Las patas son grandes y con uñas bífidas más largas que el empodio. La hembra se distingue del macho por el ovipositor (Figura 6 A y B), que porta más de diez espinas en forma de gancho. El huevo es muy pequeño de 0,20 a 0,25mm de largo y blanquecino. La larva es de color naranja-rojo, y mide aproximadamente 2,5 a 2,8 de largo y 0,5mm de ancho. La pupa es ovoide, de color marrón y su tamaño no supera los 2mm de largo (Paoli, 1907; Coutin y Katlabi, 1986; Hepdurgun y Onder, 2000; Doganlar *et al.*, 2011).

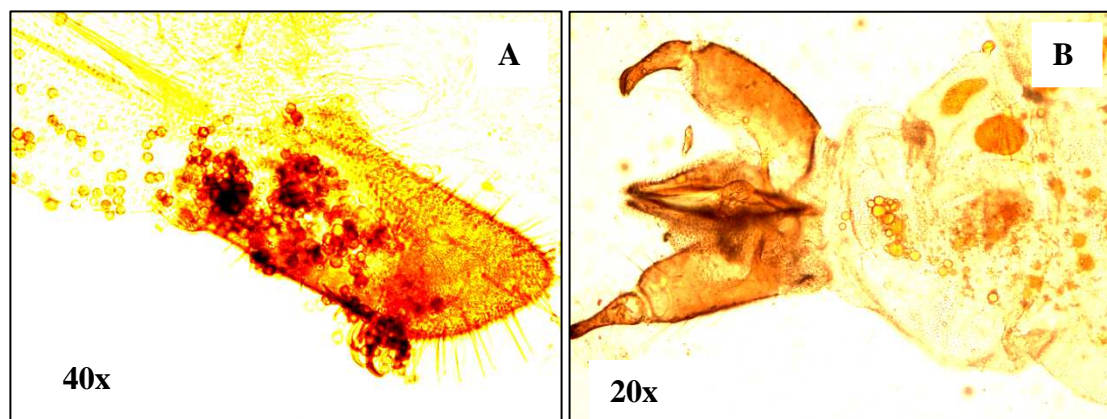


Figura 6. Aparato genital de *Prolasioptera berlesiana*: Hembra (Ovipositor) (A) y Macho (B), foto tomada por el autor de la Tesis.

2.5.1. Ciclo biológico.

Los adultos empiezan a emerger con la llegada del verano (finales de Junio o principios de Julio), con los primeros ataques de *B. oleae*. Se aparean en un tiempo muy corto (1 a 3 días). Las hembras realizan la puesta en las aceitunas, aprovechándose de las heridas de oviposición de *B. oleae*, poniendo sólo un huevo en cada herida (Civantos, 1999), aunque en ocasiones puede haber 2 o 3 (De Laurentiis, 1993). El desarrollo embrionario del huevo es dos veces más rápido que el de la mosca del olivo. En apenas 2 días nacen las larvas, que se desarrollan en el interior del fruto alimentándose del contenido de los huevos de la mosca actuando como ectoparásitos. Probablemente también se alimentan del micelio del hongo *B. dothidea*, que podría ser introducido por la hembra en el momento de la oviposición. Este hongo se desarrolla de los restos del huevo de *B. oleae* y luego sobre los tejidos del fruto (Arambourg, 1986; Sasso y Viggiani, 2007; Viggiani y Sasso, 2008). El desarrollo larvario se prolonga de 9 días en el verano a 13 días en el otoño. Las larvas de la última generación pasan el invierno en el suelo protegidas en los capullos donde se transforman en pupas (Coutin y Katlabi, 1986). Tras un periodo similar en este estado, emergen los adultos. Las generaciones de *P. berlesiana* se suceden de Agosto hasta Octubre. Normalmente en la Zona Mediterránea tiene de 2 a 4 generaciones al año y están muy influidas por las condiciones ambientales. Una generación podría durar 19 días en el verano y 28 en el otoño. La última generación anual pasa el invierno como pupa enterrada en el suelo (Neuenschwander *et al.*, 1983; Arambourg, 1986; Hepdurgun y Onder, 1999).

2.5.2. *Prolasioptera berlesiana*, ¿insecto útil o perjudicial?

El papel de este cecidómido en la entomofauna del olivo es controvertido. En el pasado, la especie se consideraba perjudicial, sobre todo en las variedades tempranas y mesa. Los frutos atacados por el mosquito presentan pequeñas manchas circulares de color amarillo, causadas por las larvas que se desarrollan en las mismas en el interior de las picadas de *B. oleae*.

Fue Silvestri en 1945 quien demostró la utilidad de *P. berlesiana* en el control biológico de la mosca. Al principio las larvas se alimentan de los huevos de la mosca. Este comportamiento como depredador puede reducir las poblaciones de la mosca del olivo hasta un 30% en condiciones favorables (Blando y Mineo 2006). Más tarde, las larvas necesitan otra fuente de alimentación para poder completar su desarrollo, siendo ésta probablemente el micelio del hongo *B. dothidea* causante del Escudete. La posibilidad de que existía una relación entre los dos agentes crea dudas sobre el papel que pueda jugar este insecto en la dispersión de esta enfermedad. Es probable que el mosquito sea más beneficioso en las primeras generaciones de verano, mientras que debe ser considerado como una plaga en otoño (Salgues, 1937; Arambourg, 1986; De Andrés-Cantero, 2001; González *et al.*, 2006).

Neuenschwander *et al.* (1983) observaron una estrecha y positiva relación entre la incidencia de *P. berlesiana* en aceitunas y las picadas no vivas de *B. oleae*. Además, observaron altas tasas de mortalidad de huevos de mosca (30 a 50%) que fueron atribuidas a la depredación por parte del cecidómido.

La caracterización de *P. berlesiana* como depredador de los huevos de la mosca del olivo o como plaga del olivo al generar el Escudete es muy compleja. Domina claramente el aspecto negativo en la aceituna de verdeo, mientras que cuando el destino de la aceituna es el molino, puede considerarse un elemento positivo al reducir el potencial reproductor las poblaciones de mosca, especialmente en los meses del verano.

En la actualidad, el método más común es evaluar la utilidad de esta especie en función del contexto ambiental, con especial referencia al potencial de producción de la aceituna, el nivel de peligro de la dinámica poblacional de la mosca en el territorio y la

variedad. Sin embargo, en la opinión general prevalece considerar *P. berlesiana* como insecto auxiliar.

Actualmente no existe un método de lucha específico para *P. berlesiana*, pero debido a su relación directa con el daño causado por *B. oleae*, el control de la misma supone una manera indirecta de gran eficacia que podría evitar la propagación del mosquito (De Laurentiis, 1993).

CAPÍTULO I.

Interacción Mosca del olivo *Bactrocera oleae* –Cecidómido *Prolasioptera berlesiana* – Escudete (*Botryosphaeria dothidea*).

INTRODUCCIÓN

El Escudete de la aceituna es una micosis aérea causada por el hongo *Botryosphaeria dothidea* (Moug.), que presenta un amplio rango de huéspedes (Slippers y Wingfield, 2007). Esta enfermedad se encuentra muy extendida en los olivares de la Zona Mediterránea. La aparición de los síntomas del Escudete en verano, en condiciones de baja humedad y elevada temperatura y en presencia de heridas, ha llevado a diversos autores a pensar en la implicación de agentes bióticos como vectores del patógeno. Así, se han detectado correlaciones de la incidencia del Escudete con los ataques de la mosca del olivo *Bactrocera oleae* y con el cecidómido *Prolasioptera berlesiana* (Verona, 1952; Harpaz y Gerson, 1966; Mateo-Sagasta, 1975; Civantos y Sánchez, 1993; Longo *et al.*, 2004).

La mosca del olivo produce heridas en las aceitunas por oviposición. La incidencia es más notoria en dos periodos, el primero de Junio a Julio y el segundo, el más importante, de Septiembre a Octubre. En estas heridas se desarrolla el Escudete. Incluso algunas referencias señalan que *B. dothidea* no se desarrolla en aceitunas que no estuviesen picadas por *B. oleae* (Harpaz y Gerson, 1966; Arambourg, 1986). Trabajos recientes mantienen que existe una relación directa entre los ataques de la mosca del olivo y la dispersión del Escudete en las aceitunas (Iannotta *et al.*, 2007; Viggiani y Sasso, 2008).

En esta interacción interviene un tercer agente, el cecidómido *P. berlesiana*, considerado un depredador de huevos de la mosca del olivo y al mismo tiempo un posible vector de *B. dothidea* (Fraval, 1997; Arambourg 1986; De Andrés-Cantero, 2001; Sasso y Viggiani, 2007). Sin embargo, estos autores señalan distintas formas de participación del mosquito en la dispersión del patógeno. Algunos lo consideran como ectoparásito, alimentándose al principio del contenido de los huevos de la mosca, pudiendo reducir sus poblaciones hasta un 30% en condiciones favorables (Blando y Mineo, 2006). Sin embargo, sus larvas necesitarían otra fuente de alimentación para poder completar su desarrollo, probablemente el tejido de la aceituna infectado por *B. dothidea* (La Greca y Vrenna, 1995; Sasso y Viggiani, 2007; Viggiani y Sasso, 2008). Otros lo consideran más bien un micófago, cuyas hembras al carecer de un fuerte oviscapto, aprovecharían las heridas de puesta de *B. oleae* y las larvas se alimentarían del micelio del hongo causante del Escudete (De Andrés-Cantero, 2001).

Los cecidómidos han evolucionado con el fin de proporcionar alimento adecuado para las larvas, implicando en muchos casos una relación íntima con hongos (Neger, 1908; Doctors van Leeuwen, 1939; Rohfritsch, 1992a; Kehr y Kost, 1999). Las especies que inducen agallas de las tribus Asphondyliini y Lasiopterini difieren de la mayoría de los cecidómidos (Mamaev, 1975) en que sus larvas muestran características del ancestral hábito micetófago. En las agallas de estas especies no se induce la formación de tejido nutritivo, sino que está presente micelio fúngico con características citoquímicas típicas de un tejido nutritivo (Meyer, 1987; Bronner, 1992; Yukawa y Rohfritsch, 2005). Las especies de mosquitos Asphondyliini atacan a estructuras reproductivas como flores y botones, mientras que las de Lasiopterini son capaces de utilizar un medio rico en micelio de hongos saprófitos y los productos de descomposición de tejidos duros de la planta. El daño en las plantas se deriva de una acción sinérgica del mosquito con el hongo asociado (Mamaev, 1975).

Las investigaciones realizadas sobre la interacción de cecidómidos y hongos indican que el género *Botryosphaeria* está bastante extendido en las asociaciones con muchas especies de cecidómidos (Shun *et al.*, 2012). La especie *B. dothidea* se ha encontrado asociada a cecidómidos del género *Asphondylia* (Adair *et al.*, 2009) y también a *Illiciomyia yukawai* (Shun *et al.*, 2012). Además, el hongo *B. dothidea* tiene un amplio rango de huéspedes (Slippers y Wingfield, 2007) entre los cuales se encuentra el olivo, causando en este cultivo la enfermedad del Escudete de la aceituna.

La posibilidad de que en el olivar exista una relación entre *B. dothidea* y el cecidómido *P. berlesiana* suscita una gran duda sobre el papel que pueda jugar el mosquito en la dispersión de esta enfermedad. Es probable que el mosquito sea más beneficioso en las primeras generaciones de verano, mientras que debe ser considerado como una plaga en otoño (Salgues, 1937; Arambourg, 1986; De Andrés-Cantero, 2001; González *et al.*, 2006).

La caracterización de *P. berlesiana* como depredador de los huevos de la mosca del olivo o como plaga del olivo al generar el Escudete no es fácil de establecer. Domina claramente el aspecto negativo en la aceituna de verdeo, mientras que cuando el destino de la aceituna es el molino puede considerarse un elemento positivo, al reducir el potencial reproductor de las poblaciones de mosca, especialmente en los meses del verano.

A pesar del esfuerzo realizado por los investigadores para desentrañar las interacciones de *B. dothidea* con *B. oleae* y *P. berlesiana* (Verona, 1952; Harpaz y Gerson, 1966; La Greca y Vrenna, 1995; González *et al.*, 2006), la naturaleza de las mismas no es bien conocida, aunque es determinante en las epidemias de Escudete. Por lo tanto, es de interés aclarar estas interacciones para adoptar medidas adecuadas de control de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Período y ubicación del estudio.

El estudio se ha llevado a cabo durante tres campañas (2009-2011) en un olivar pertenece a la finca experimental del instituto de investigación y formación agraria y Pesquera (IFAPA), situada en el término municipal de Cabra (Córdoba), España, en el polígono catastral número 25, en las faldas de la comarca subbética cordobesa, a 73km al sudeste de la capital cordobesa y 488m de altura (Figura 7). Se utilizaron tres variedades, Picudo, Hojiblanca y Gordal situadas en las parcelas cuyas características se indican en la Tabla 1. El sistema de cultivo es el tradicional, labrado periódicamente.

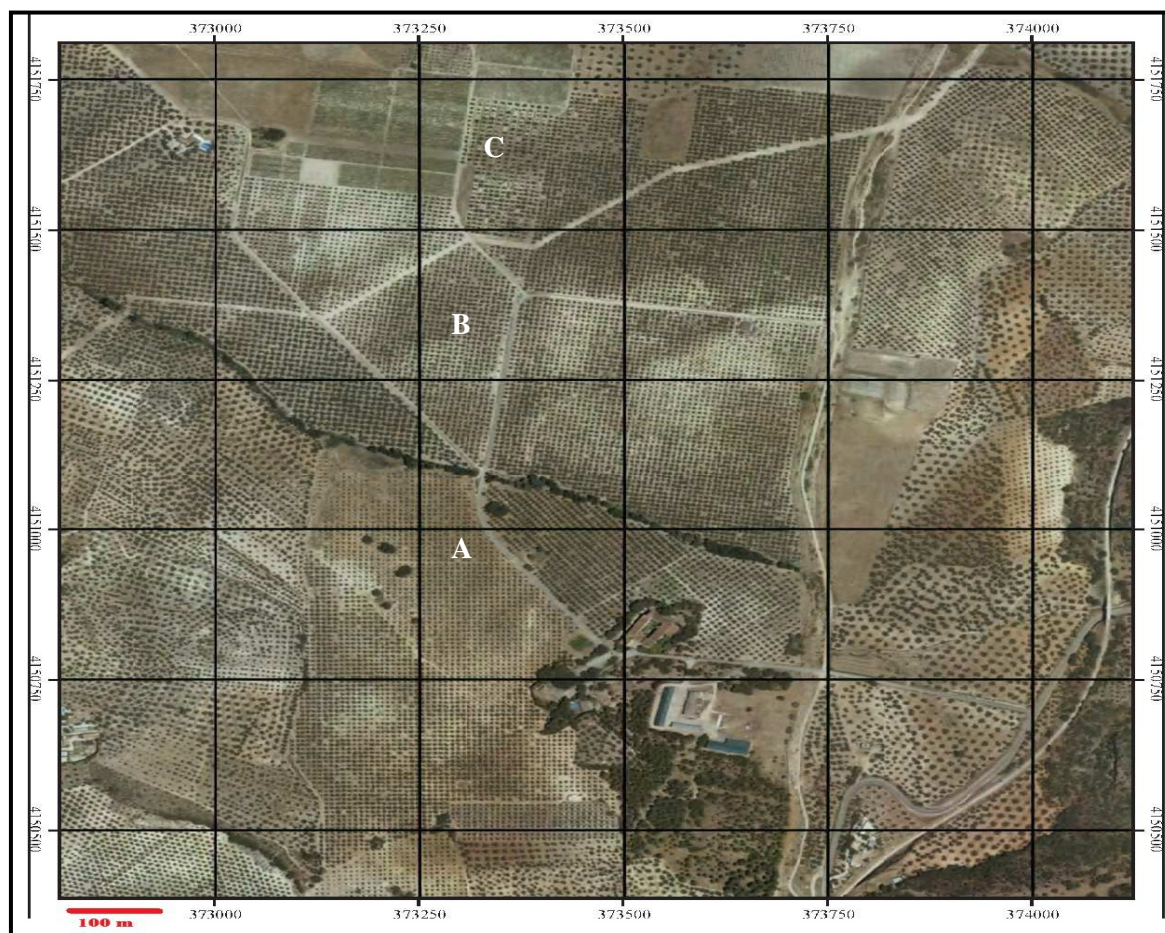


Figura 7. Vista aérea de las parcelas objeto del estudio. Fuente: Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC).

Tabla 1. Datos identificativos e informativos de las parcelas donde se llevó a cabo el estudio.

<i>Variedad</i>	<i>Nº de parcela</i>	<i>Superficie (has)</i>	<i>X(m)</i>	<i>Y (m)</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>Marco de plantación (m)</i>
PICUDO	255	15,9	373.247	4150.798	5 – 20	7×7
HOJIBLANCA	232	75,4	373.385	4151.623	5 – 20	7×7
GORDAL						

Fuente: Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC).

2. Recogida de muestras de aceitunas.

2.1. Periodo de muestreo.

Los muestreos de aceitunas se realizaron durante el período de estudio (2009-2011), de las tres variedades mencionadas.

Primera campaña 2009.

Se realizaron seis muestreos de aceitunas de Octubre a Noviembre (Tabla 2). Las aceitunas tomadas presentaron siempre lesiones debidas a *B. oleae* y/o síntomas de Escudete (Figura 8 A y B).

Tabla 2. Muestreos de aceitunas recogidas durante la campaña 2009.

<i>Fecha de recogida</i>	<i>Número de aceitunas recogidas por variedad</i>		
	<i>GORDAL</i>	<i>HOJIBLANCA</i>	<i>PICUDO</i>
6-10	17	21	15
15-10	17	41	37
20-10	121	166	35
23-10	125	267	13
27-10	260	250	33
10-11	373	510	55
Total	913	1.255	188



Figura 8. Picadas de *Bactrocera oleae* [sin síntomas de Escudete (A), con síntomas de Escudete (B)].

Segunda campaña 2010.

Se realizaron cuatro muestreos de aceitunas, de Octubre a Noviembre (Tabla 3). En cada muestreo se eligieron 15 árboles por variedad, de cada árbol se recogieron 15 aceitunas aleatoriamente, resultando un total de 225 aceitunas.

Tabla 3. Muestreos de aceitunas recogidas durante la campaña 2010.

<i>Fecha de recogida</i>	<i>Número de aceitunas recogidas por variedad</i>		
	<i>GORDAL</i>	<i>HOJIBLANCA</i>	<i>PICUDO</i>
5-10	225	225	225
19-10	225	225	225
3-11	225	225	225
26-11	225	225	-
Total	900	900	675

No se pudo recoger muestras porque se había realizado la recolección.

Tercera campaña 2011.

Se realizaron primero dos muestreos en la variedad Gordal donde se recogieron aceitunas que presentaron siempre síntomas del Escudete. Más tarde se hizo un muestreo aleatorio en las tres variedades (Tabla 4).

Tabla 4. Muestreos de aceitunas recogidas durante la campaña 2011.

<i>Fecha de recogida</i>	<i>Número de aceitunas recogidas por variedad</i>		
	<i>GORDAL</i>	<i>HOJIBLANCA</i>	<i>PICUDO</i>
26-09	194	-	-
4-10	241	-	-
17-11	400	400	400
Total	835	400	400

No se recogieron muestras.

2.2. Evaluación en laboratorio.

En todas las campañas las aceitunas de cada muestreo fueron transportadas en bolsas de plástico cerradas y separadas por variedad al laboratorio de la Unidad de Entomología Agroforestal del Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba, donde fueron guardadas en el frigorífico a 5°C. El procesado de las muestras se inició desde el momento de su llegada al laboratorio. Las aceitunas se examinaron individualmente al microscopio estereoscópico (Olympus SZX9). Los criterios de observación fueron los siguientes: 1) Presencia de picada de mosca (con picada y sin picada); 2) Las aceitunas con picada se dividieron a su vez en otros dos grupos: picada viva “con presencia de huevo, larva, pupa y galerías abandonadas” (Figura 9) y picada no viva (picada falsa, cabe mencionar que se podría haber considerado como picada no viva picadas que en realidad tenían huevos de *B. oleae* que fueron depredados por el cecidómido sin dejar rastro visible); 3) Tanto en las picadas vivas y no vivas se comprobó si había presencia del cecidómido *P. berlesiana* “huevo, larva y pupa” (Figura 10).

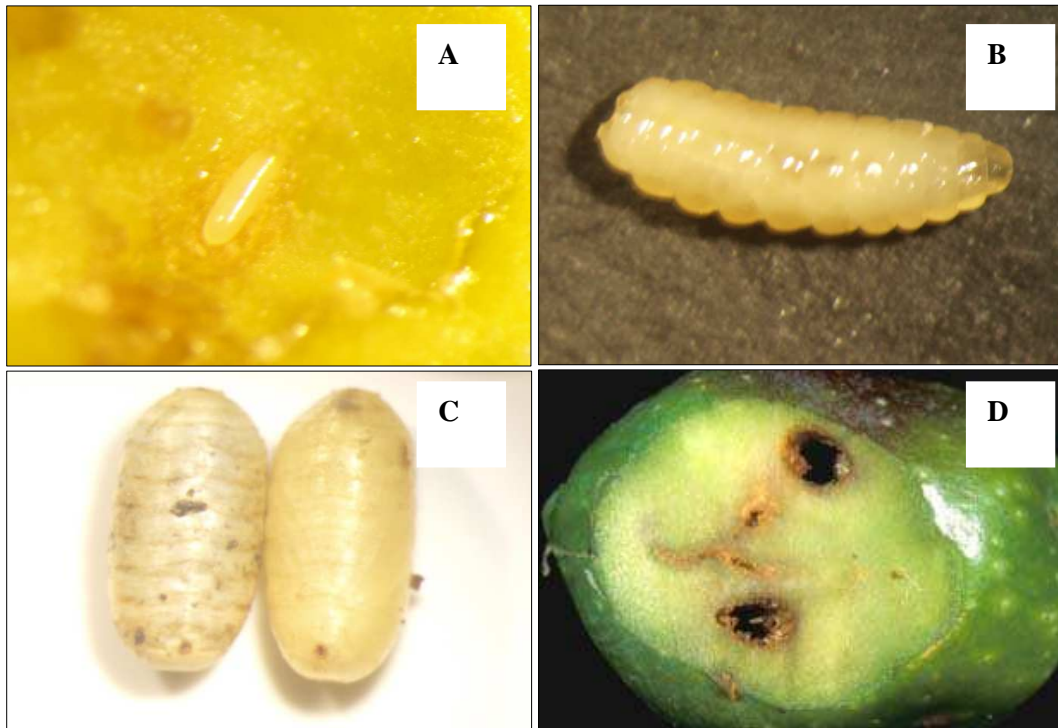


Figura 9. Estados preimaginales de *Bactrocera oleae* [Huevo (A), Larva (B) y Pupa (C)], Galería abandonada de la mosca (D).

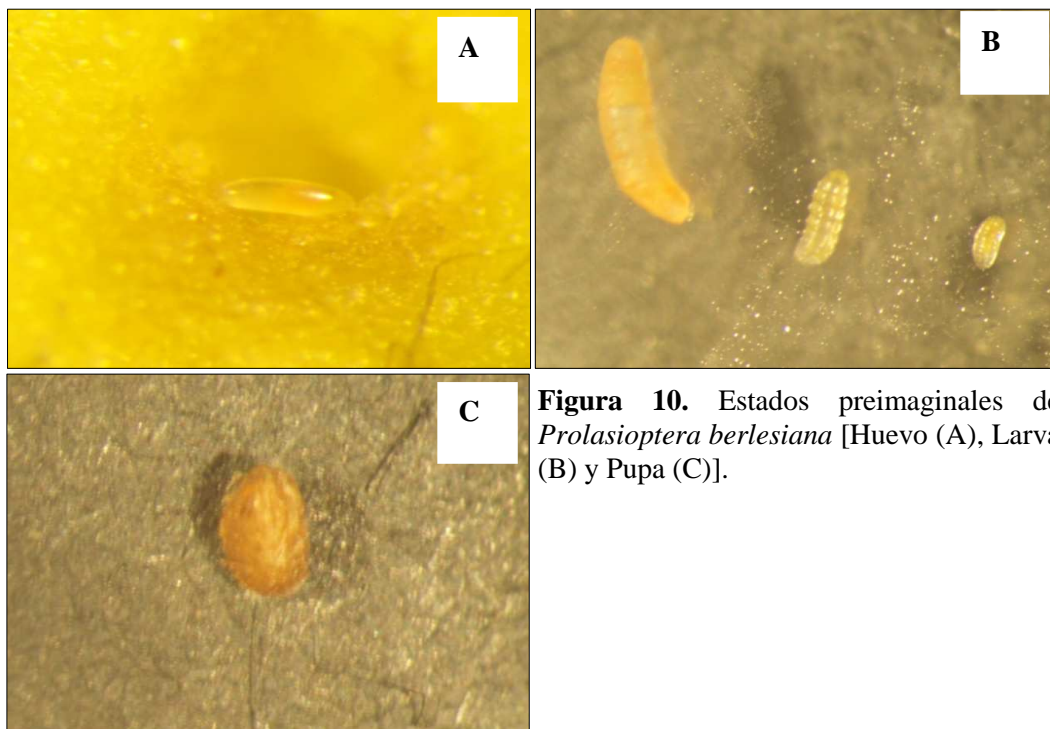


Figura 10. Estados preimaginales de *Prolasioptera berlesiana* [Huevo (A), Larva (B) y Pupa (C)].

2.3. Detección del patógeno *Botryosphaeria dothidea* en aceitunas.

Para la detección del patógeno *B. dothidea* en aceitunas se emplearon los dos métodos siguientes:

2.3.1. Aislamientos en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA).

De todas las aceitunas que presentaron síntomas del Escudete se realizaron aislamientos en medio de cultivo (PDA). Para ello, se cortaron cinco trozos pequeños del interior de la zona lesionada con la ayuda de un escalpelo (Figura 11 A), que se desinfectaron con lejía al 15% durante 40 segundos y se dejaron secar sobre papel de filtro estéril en la cabina de flujo laminar. Una vez secos, los cinco trozos se dispusieron en una placa Petri de 90mm de diámetro con medio de PDA. Las placas se sellaron con Parafilm® indicando las referencias requeridas en cada una de ellas (Figura 11 B) y se colocaron en la incubadora a $22\pm3^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo de 12 horas de luz. A los cuatros días de incubación las placas fueron observadas para identificar a los hongos aislados.

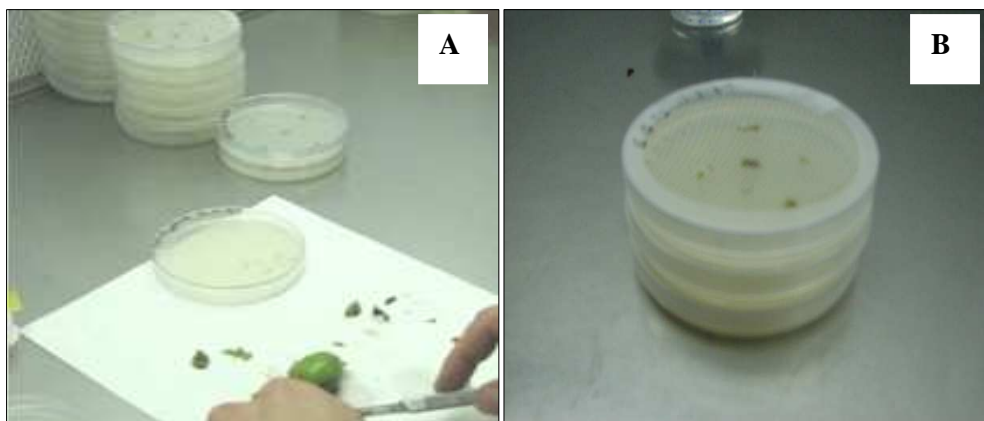


Figura 11. Aislamientos del hongo *Botryosphaeria dothidea* de aceitunas en medio de cultivo PDA.

2.3.2. Inducción de estructuras del patógeno mediante cámaras húmedas.

Las aceitunas que no presentaron síntomas de la enfermedad (Escudete) se metieron en cámara húmeda. Para ello, las aceitunas se lavaron con agua corriente durante 20 minutos y se secaron a continuación con papel de filtro estéril (Figura 12 A y B). Las aceitunas se colocaron en una bandeja con perlita previamente esterilizada en autoclave durante 20

minutos a 121°C, humedecida con agua destilada estéril. La bandeja había sido previamente lavada y desinfectada en un baño de lejía al 10% durante 3 horas (Figura 12 C). Con las aceitunas colocadas y separadas por categorías, la bandeja se introdujo en una bolsa negra de plástico, que se cerró herméticamente y se colocó en la incubadora a 25°C. Todo el proceso se efectuó en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar. Semanalmente, durante tres semanas, se observaron las bandejas y se evaluó la incidencia de aceitunas afectadas por el patógeno *B. dothidea*. (Figura 12 D).

Los hongos que se desarrollaron en las placas de Petri y sobre la superficie de las aceitunas puestas en cámaras húmedas fueron identificados mediante la observación de las estructuras fúngicas producidas teñidas en portaobjetos con azul de lactofenol al microscopio óptico (Nikon eclipse 90i) (Figura 12 E, F, G y H).

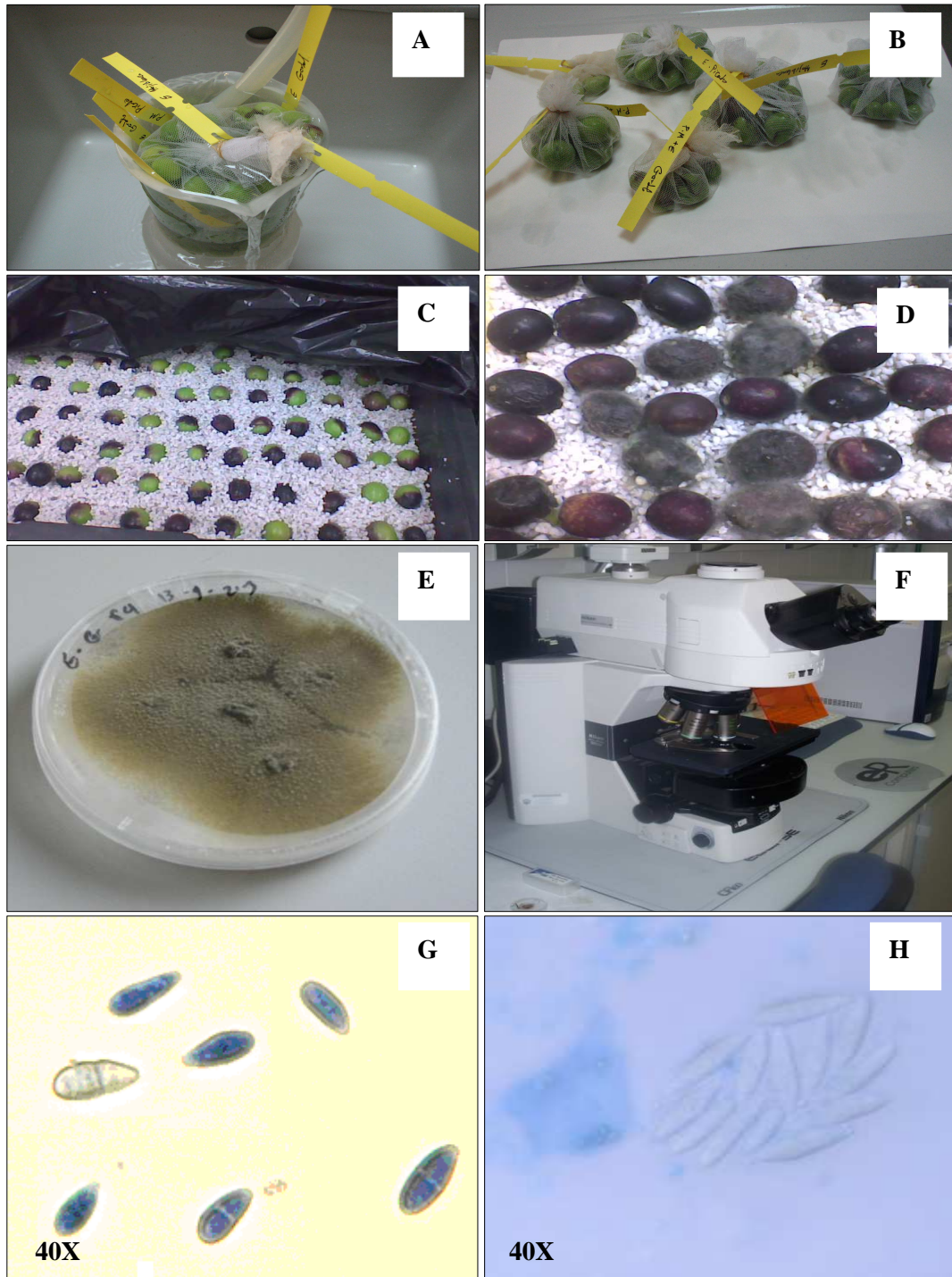


Figura 12. Preparación de cámaras húmedas (A, B, C). Aceitunas infectadas por el hongo *Botryosphaeria dothidea* en cámara húmeda (D). Crecimiento del hongo *Botryosphaeria dothidea* en PDA (E). Microscopio Óptico (Nikon eclipse 90i) (F). Conidios de *Botryosphaeria dothidea* [tipo redondeado, ovoides-piriformes, frecuentemente oscuros y septados (G) y tipo alargado: fusiformes, hialinos y mayoritariamente aseptados (H)].

3. Observaciones de aceitunas en campo.

A partir de Julio hasta Noviembre del 2010 se realizaron en el campo observaciones visuales de aceitunas en el árbol en las tres variedades. Para cada fecha de observacion se eligieron al azar 10 árboles por variedad, examinando en cada árbol 4 ramos (con 20 a 25 aceitunas aproximadamente), uno por cada orientación cardinal. En las observaciones se registró el número de aceitunas con picadas de mosca y/o con síntomas de Escudete. Aquéllas que presentaban picada o síntomas de la enfermedad se recogieron en bolsas separadas y se trasladaron al laboratorio para comprobar la presencia del cecidómido *P. berlesiana* mediante observaciones al microscopio estereoscópico. La confirmación de la enfermedad fue contrastada mediante los procedimientos de aislamiento y posterior identificación indicados anteriormente.

4. Incidencia de las poblaciones naturales de los adultos de *Bactrocera oleae*.

En Julio del 2010, en cada una de las tres variedades se instalaron dos trampas alimenticias (“Polillero de Econex) cebadas con 300ml de una solución al 40% p/v del atrayente de fosfato biamónico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, producto comercial y suministrado por Manuel Riesgo S.L. (Figura 13). Las trampas se revisaron semanalmente hasta Noviembre del mismo año, anotando el número de adultos capturados y renovando la solución del atrayente.



Figura 13. Captura de adultos de mosca del olivo mediante trampas alimenticias (Polillero de Econex).

Los datos meteorológicos de temperatura y humedad para la campaña 2010 se obtuvieron de la página web de la Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente, Red de

Información AgroClimática del (IFAPA), estación meteorológica de RIA-CIFA-Cabra, Área Climática Sierras Subbéticas (Tabla 5).

Tabla 5. Datos meteorológicos (temperatura y humedad relativa) registrados durante el periodo de las observaciones (Campaña 2010) en la zona del estudio.

<i>Fecha</i>	<i>Temperatura media diaria (°C)</i>	<i>Humedad relativa media diaria (%)</i>
13-7	29,3	41,3
20-7	27,6	44,6
27-7	27,9	46,3
3-8	28,9	43,8
10-8	29,3	42,3
17-8	28,7	45,1
24-8	26,9	55,1
31-8	29,0	41,0
07-9	27,7	45,8
14-9	24,5	42,9
21-9	23,9	56,3
28-9	21,2	62,8
5-10	19,6	54,8
13-10	18,4	68,7
19-10	16,8	77,9
27-10	15,1	65,4
3-11	13,9	74,7

Fuente. Junta de Andalucía, Conserjería de Medio Ambiente, Red de Información AgroClimática (IFAPA), Cabra.

5. Detección de *Botryosphaeria dothidea* en insectos.

5.1. Obtención de los insectos.

5.1.1. Adultos y estados inmaduros de *Bactrocera oleae*.

Los adultos de *B. oleae* utilizados fueron capturados mediante trampas de feromonas del tipo EOSTRAP® INVAGINADA (Figura 14 A). Para ello, se instalaron 3 trampas por variedad, desde Agosto a Noviembre durante las campañas de 2009 y 2010. En cada trampa

en su parte superior se colocó un difusor (DACUSNEX4) para la atracción de hembras y machos (Figura 14 B). Las trampas fueron cebadas con pastillas de insecticida DDVP de ECONEX (Figura 14 C) y se ubicaron en la cara sur del árbol a una altura de 1,5 - 2m. La revisión fue semanal recogiendo las hembras capturadas en tubos de plástico (Figura 14 D) que fueron llevadas al laboratorio donde se conservaron en el frigorífico a 5°C hasta la realización de los aislamientos.

Los huevos, larvas y pupas se obtuvieron mediante observaciones en laboratorio a partir de aceitunas infestadas por la mosca.

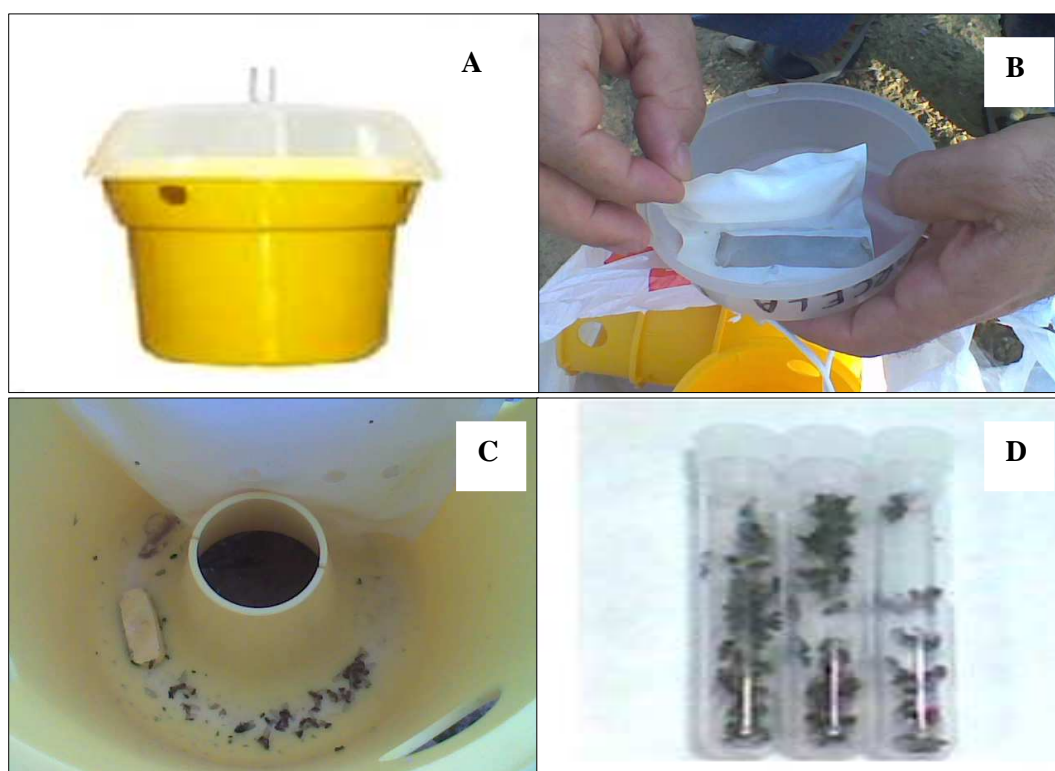


Figura 14. Captura de adultos de mosca del olivo mediante trampas de feromonas (EOSTRAP® INVAGINADA).

5.1.2. Adultos y estados inmaduros de *Prolasioptera berlesiana*.

El material biológico utilizado fue obtenido de aceitunas recolectadas en el campo que presentaban síntomas de Escudete. Los estados inmaduros (huevo, larva y pupa) fueron extraídos de las aceitunas, mientras que los adultos (hembras), se obtuvieron a partir de aceitunas (con huevos, larvas o pupas) incubadas bajo las condiciones del insectario (26-28°C,

60-65% HR y 16 horas de luz) (Figura 15). Todo este material se conservó en el frigorífico a 5°C hasta la realización de los aislamientos.



Figura 15. Obtención de adultos (hembras) de *Prolasioptera berlesiana* bajo las condiciones del insectario.

5.2. Detección del *Botryosphaeria dothidea* mediante métodos microbiológicos.

Con el propósito de detectar el hongo *B. dothidea* en adultos y estados inmaduros de *B. oleae* y *P. berlesiana*, se realizaron aislamientos tanto de la superficie como del interior de los individuos. Para ello se utilizó medio de cultivo de PDA ácido (PDA al que se le añadieron 10 gotas de ácido láctico al 85%). En los aislamientos, con objeto de detectar el patógeno en la superficie de los individuos, éstos fueron distribuidos en placas petrí de 90mm de diámetro con el medio, colocando 5 individuos por placa (Figura 16 A). Por otro lado, para los aislamientos de los tejidos internos, un número de individuos de cada especie y estadio fueron desinfectados superficialmente con lejía 15% durante 40 segundos y lavados después con agua destilada estéril. Después de secarlos con papel de filtro estéril, se sumergieron en 5ml de agua destilada estéril y se trituraron con homogeneizador eléctrico (Figura 16 B y C). A partir del macerado inicial se hicieron diluciones de 0.1, 0.01 y 0.001. Seguidamente se tomaron 300µl de cada una de las diluciones, además del macerado inicial, y se hizo una siembra masal (Figura 16 D). Las placas se cerraron con parafilm y se colocaron en la incubadora a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo de 12 horas de luz.

Los hongos aislados fueron identificados mediante observación de las estructuras fúngicas producidas en portaobjetos con azul de lactofenol al microscopio óptico y en su caso,

la entidad del hongo fue confirmada mediante análisis moleculares basados en “nested-PCR” según la metodología de Moral *et al.* 2010.

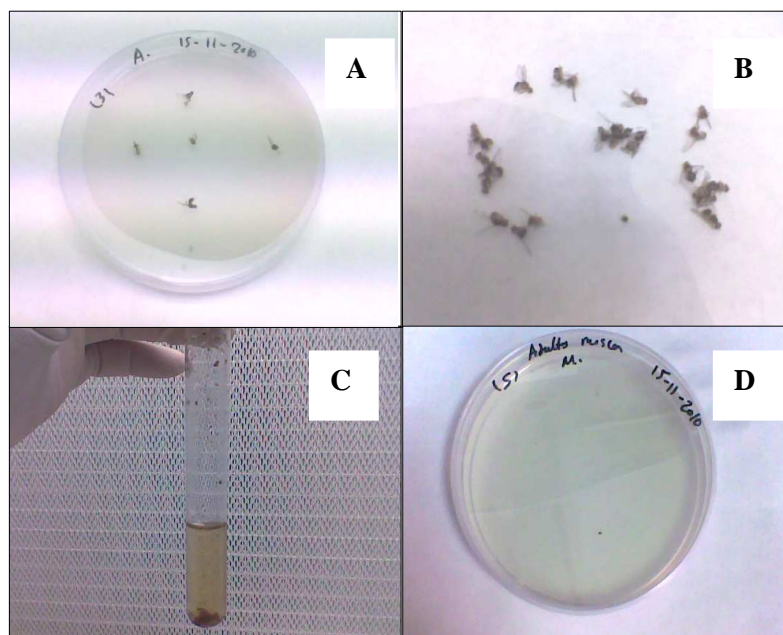


Figura 16. Aislamientos del hongo *Botryosphaeria dothidea* de hembras de *Bactrocera oleae* en medio de cultivo PDA.

5.3. Observaciones microscópicas de las hembras de *Prolasioptera berlesiana*.

Las hembras de algunos cecidómidos llevan una cámara para almacenar los conidios de los hongos asociados. Esas cámaras normalmente se encuentran en la parte posterior del abdomen junto al ovíscapto. Con el propósito de comprobar si el mosquito *P. berlesiana* lleva algo similar en estas cámaras y la posibilidad de detectar la presencia de *B. dothidea* en su interior, las hembras recién emergidas se colocaron en un tubo eppendorf en una solución de KOH 5% durante 24 horas, la cual permite aclarar suficientemente el abdomen del insecto. Los tejidos se lavaron después con agua estéril y se examinaron al microscopio óptico. Las observaciones se hicieron con el insecto completo o separando el abdomen del resto del cuerpo (Figura 17 A, B y C).

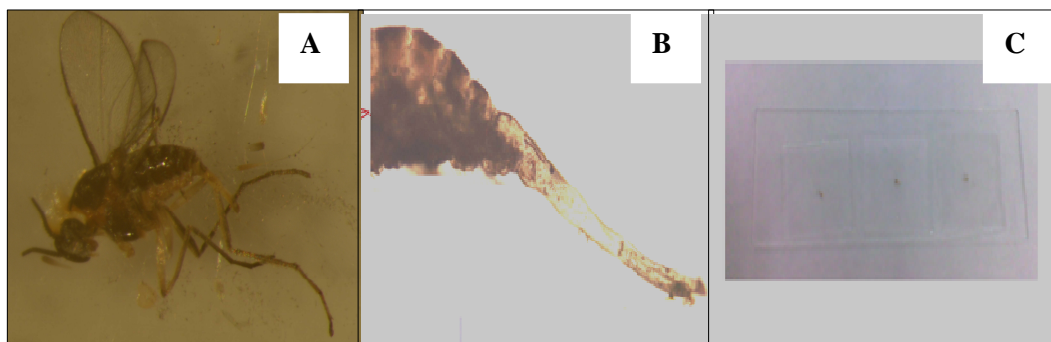


Figura 17. Observaciones microscópicas en las hembras de *Prolasioptera berlesiana* para comprobar la presencia de *Botryosphaeria dothidea*.

6. Presencia de *Prolasioptera berlesiana* y *Botryosphaeria dothidea* en picadas artificiales.

6.1. Picada artificial simulando la picada de mosca (PSM).

Con objeto de comprobar la presencia de mosquito *P. berlesiana* y el desarrollo del Escudete en picadas sin huevos de la mosca *B. oleae*, se realizaron en campo heridas artificiales simulando la picada de la mosca del olivo. Durante la campaña del 2010 se realizó un experimento que se repitió en dos periodos, el primero fue en el 27 de Julio, el segundo el 31 de Agosto. Cada experimento consistió en elegir 30 árboles al azar (10 árboles por variedad), marcando en cada árbol 4 ramos (uno por cada orientación cardinal) cada uno de ellos conteniendo de 20 a 25 aceitunas. Las heridas se efectuaron mediante un alfiler diseñado al efecto ajustándose lo más posible a las medidas del ovíscapo de la mosca del olivo (Figura 18 A). Se realizó una herida en cada aceituna simulando la picada de la mosca (aproximadamente 1mm de profundidad, 0,5mm, 45° de ángulo) (Figura 18 B). Se realizaron heridas en dos de los cuatro ramos; las otros dos se dejaron sin heridas y sirvieron como testigo.

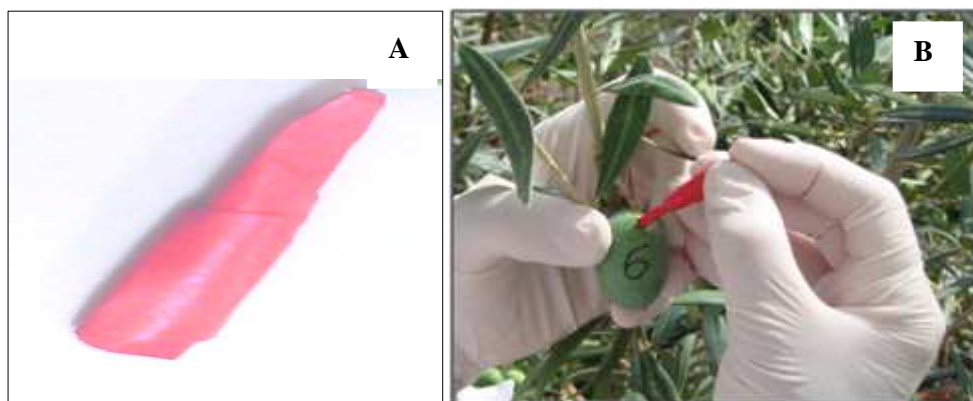


Figura 18. Realización de picadas artificiales (simulando la picada de *Bactrocera oleae*) en aceitunas.

En los dos experimentos, las ramas fueron examinadas semanalmente hasta mediados del mes de Octubre, registrando el número de aceitunas con síntomas de la enfermedad. Las aceitunas que presentaron síntomas del Escudete fueron trasladadas al laboratorio, donde fueron observadas en el microscopio estereoscopio para detectar la presencia del cecidómido *P. berlesiana*.

6.2. Picada artificial irregular (PIR).

A finales de Septiembre del 2011 se eligieron aleatoriamente cuatro árboles de la variedad Gordal y en cada uno ellos se marcaron seis ramos (con una media 45 aceitunas/ramo). En dos de los ramos se efectuaron picadas artificiales en las aceitunas simulando la picada de mosca (PSM) (Figura 19 A), en otros dos se realizaron picadas irregulares (PIR) (Figura 19 B) y los dos restantes se dejaron sin picar como testigos. Las aceitunas fueron recogidas en dos fases, la primera mitad a 24 horas y la segunda a 48 horas. Una vez en el laboratorio, después de ser examinadas para contabilizar las que tenían el cecidómido *P. berlesiana*, todas las aceitunas se introdujeron en cámaras húmedas para detectar al patógeno *B. dothidea*.

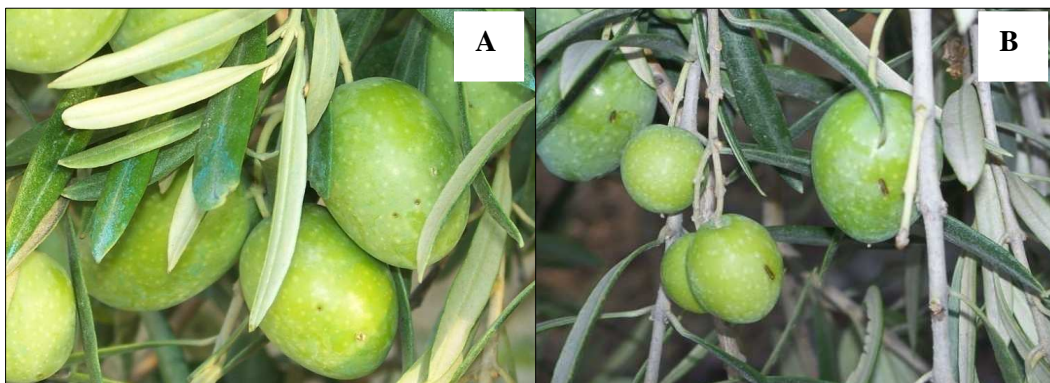


Figura 19. Aceitunas con picadas artificiales [Picada simulando la picada de mosca (PSM) (B) y Picada irregular (PIR) (A)].

Por otro lado, al mismo tiempo se efectuaron heridas irregulares en aceitunas de la misma variedad con objeto de ver el desarrollo del Escudete durante un tiempo más prolongado. Para ello, en otros 5 árboles se marcaron seis ramos por árbol (cada uno con 20-25 aceitunas). En cuatro de ellos se realizaron picadas irregulares y dos ramos se dejaron sin realizar heridas como testigo. Las aceitunas fueron observadas semanalmente en campo anotando el número de aceitunas con síntomas de Escudete (Figura 20 A), las cuales fueron llevadas al laboratorio para comprobar la presencia del cecidómido (Figura 20 B).

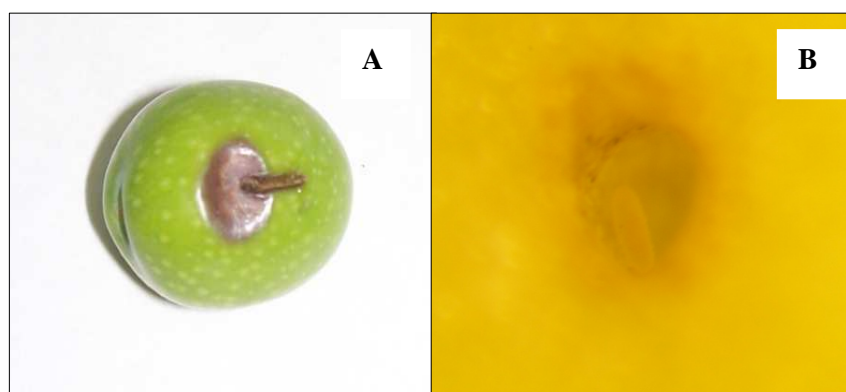


Figura 20. Aceituna con picada irregular con síntomas de Escudete (A). Picada irregular con larva del cecidómido (B).

7. Comprobación del desarrollo del Escudete en picadas artificiales recién efectuadas.

Las picadas artificiales fueron realizadas en aceitunas de la variedad Gordal a mediados de Octubre del 2011. Se efectuaron heridas simuladas a la picada de mosca (PSM) y picadas irregulares (PIR). A las 48 horas después de la picada, se recogieron 120 aceitunas de cada tipo y 60 aceitunas sanas (sin lesión) como control. En el mismo día de la recogida, las

aceitunas se clasificaron en el laboratorio en función de la presencia del cecidómido y, después de ser lavadas con agua corriente durante 20 minutos, se realizaron aislamientos para detectar el patógeno *B. dothidea*. El aislamiento se realizó tomando pequeños trozos del interior de las picadas que fueron sembrados (cinco trozos por placa) en medio de PDA. A los cuatro días las placas fueron observadas para registrar el número de placas con presencia del patógeno *B. dothidea*.

8. Desarrollo del *Prolasioptera berlesiana* bajo condiciones controladas.

A finales de Septiembre del 2010, se efectuaron heridas en aceitunas sanas de la variedad Gordal empleando un alfiler, simulando la picada de la mosca (Figura 21 A). Una parte de las aceitunas fueron recogidas 24 horas después de realizar la picada, se trasladaron al laboratorio y se comprobó la presencia de huevos del cecidómido en el interior de las heridas provocadas (Figura 21 B). Para determinar el periodo de desarrollo completo, las 74 aceitunas con puesta del mosquito que resultaron se pusieron en cajas cilíndricas de plástico transparente, de 11,5cm de diámetro y 4,5cm de altura, cerradas con parafilm y con ventanas de malla para la ventilación (Figura 21 C), se incubaron bajo condiciones controladas del insectario (26-28°C, 60-65% HR y 16 horas de luz) y fueron revisadas diariamente hasta la emergencia de los adultos.

El cálculo del tiempo de desarrollo para cada uno de los estadios preimaginales fue según la siguiente formula

$$T = (tn_1 + tn_2 + tn_3 + \dots + tn_n) / N^o$$

donde:

T= tiempo completo de desarrollo de cada estado.

tn= tiempo de desarrollo de cada individuo.

N° = número total de individuos.

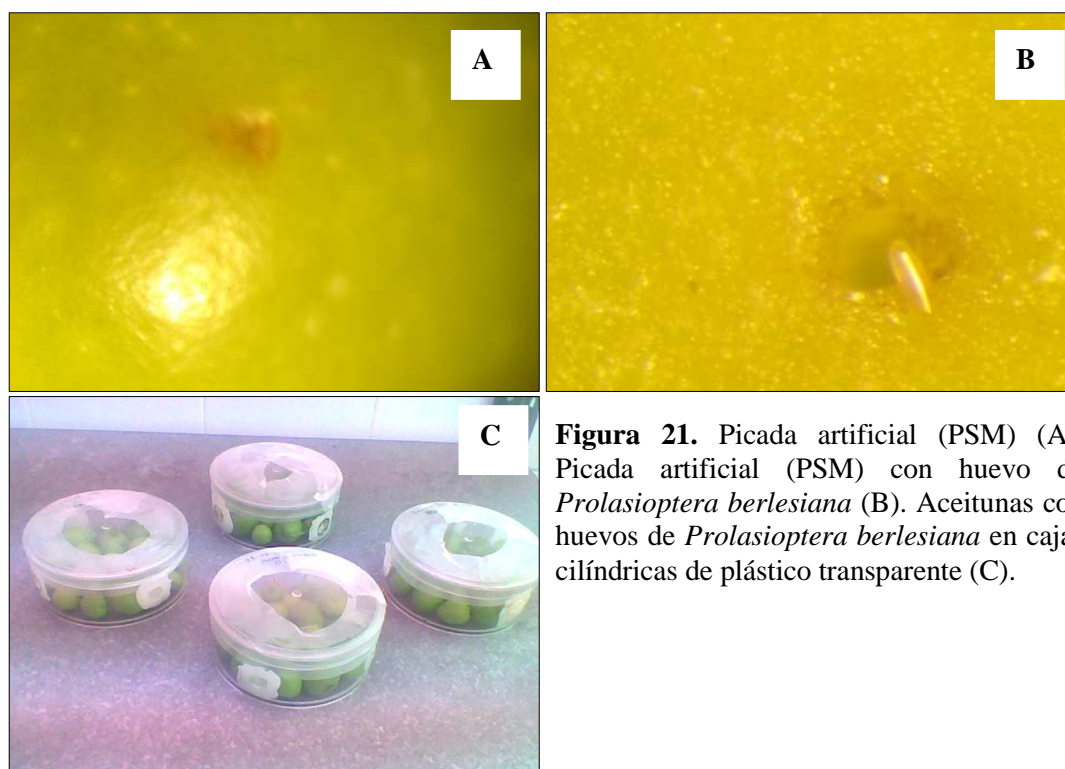


Figura 21. Picada artificial (PSM) (A). Picada artificial (PSM) con huevo de *Prolasioptera berlesiana* (B). Aceitunas con huevos de *Prolasioptera berlesiana* en cajas cilíndricas de plástico transparente (C).

9. Comportamiento alimenticio de las larvas del cecidómido *Prolasioptera berlesiana*.

Las larvas utilizadas en este experimento fueron recolectadas mediante heridas artificiales (PSM) de aceitunas de la variedad Gordal en campo y recogidas 24 horas después.

El comportamiento alimenticio del cecidómido fue evaluado mediante dos métodos. El primero consistió en extraer las larvas vivas de *P. berlesiana* del interior de las heridas, sin síntomas aparentes del Escudete, y colocarlas en placas petri con crecimiento activo de *B. dothidea*. Se utilizaron en total 30 larvas recién nacidas (menos de 24 horas de edad), que fueron distribuidas en 10 placas (Figura 22 A y B). Las placas fueron incubadas en las condiciones del insectario (26-28°C, 60-65% HR y 16 horas de luz) hasta la salida de los adultos (Figura 22 C). Se registró el número de adultos emergidos indicando así las larvas que pudieron completar su desarrollo sobre el hongo en medio de cultivo.

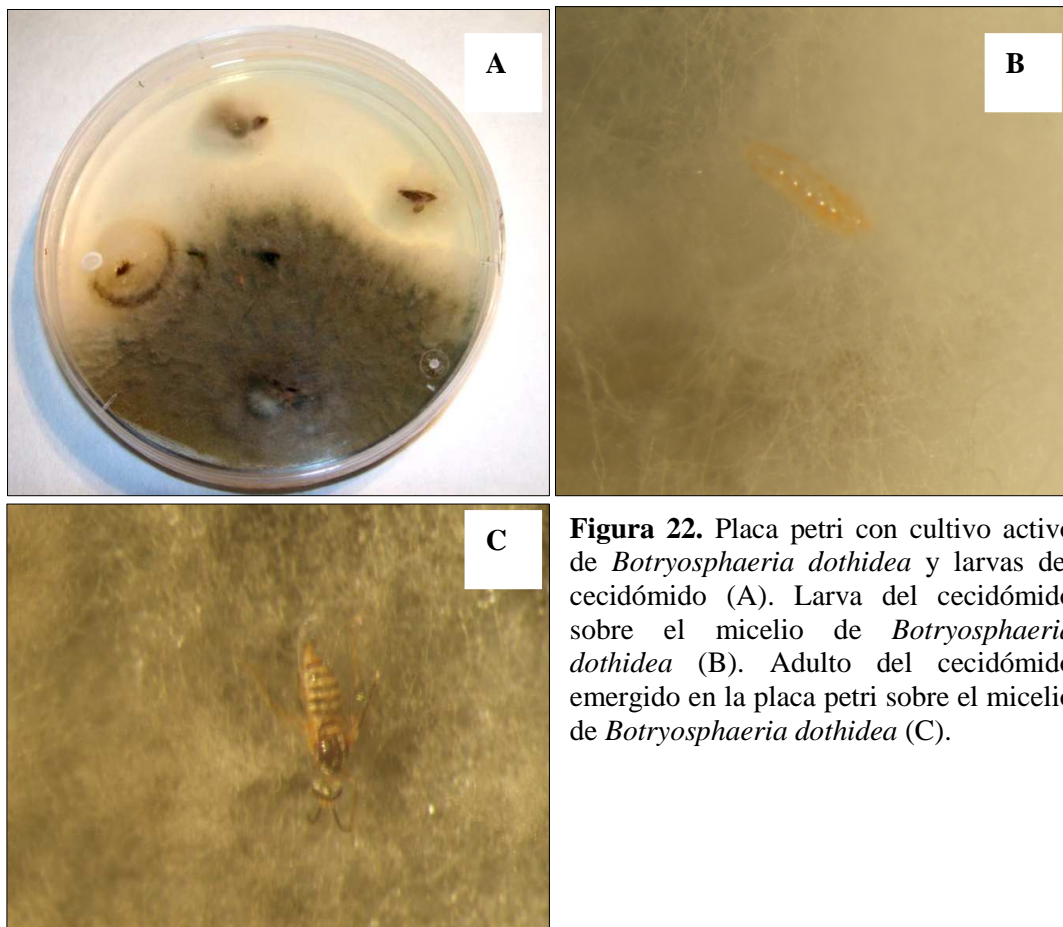


Figura 22. Placa petri con cultivo activo de *Botryosphaeria dothidea* y larvas del cecidómido (A). Larva del cecidómido sobre el micelio de *Botryosphaeria dothidea* (B). Adulto del cecidómido emergido en la placa petri sobre el micelio de *Botryosphaeria dothidea* (C).

En el segundo método, un grupo de huevos y larvas de *P. berlesiana* fueron transferidos a aceitunas sanas, previamente desinfectadas con lejía comercial al 15% durante 40 segundos, y otro grupo a aceitunas sin desinfectar. En cada grupo se utilizaron 32 larvas (una larva por aceituna). Antes de la transferencia de los individuos, las aceitunas fueron artificialmente picadas PSM (Figura 23 A). Las aceitunas con los individuos transferidos (Figura 23 B) se introdujeron en grupos de ocho en cajas cilíndricas de plástico transparente y se incubaron en las condiciones del insectario (26-28°C, 60-65% HR y 16 horas de luz). Las cajas fueron observadas diariamente durante 3 semanas (Figura 23 C).

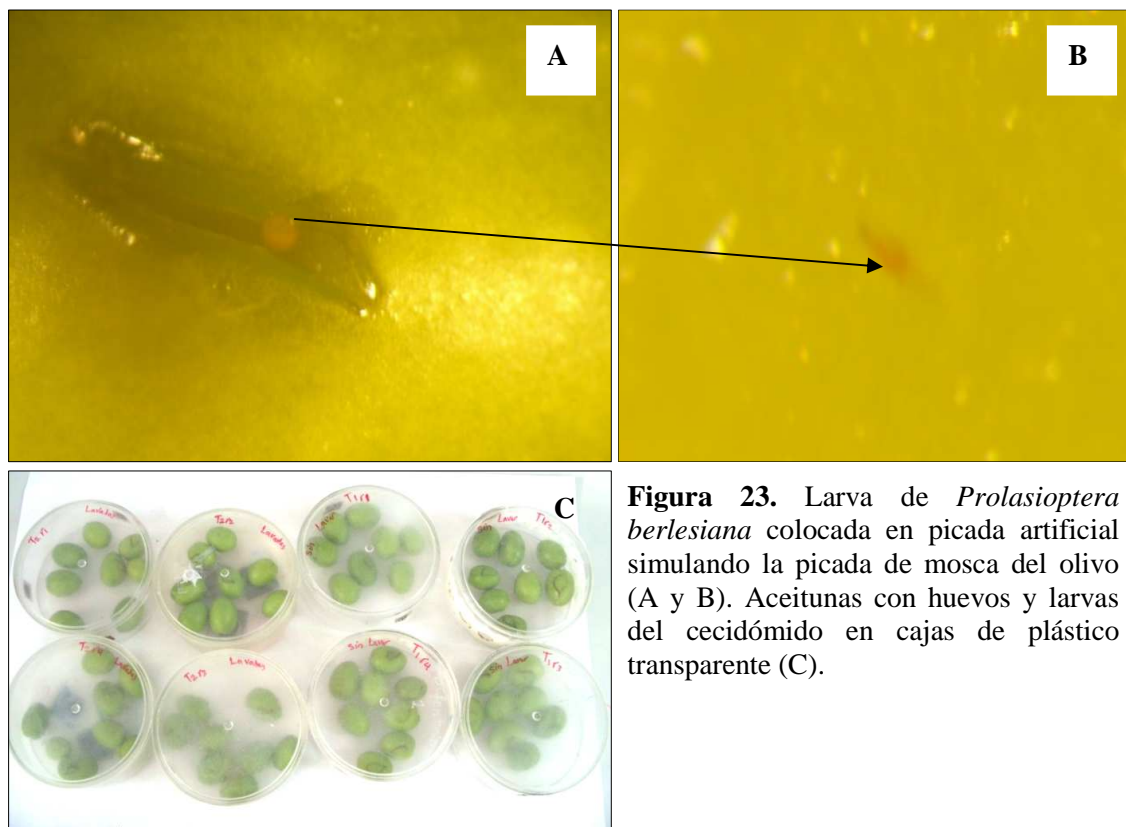


Figura 23. Larva de *Prolasioptera berlesiana* colocada en picada artificial simulando la picada de mosca del olivo (A y B). Aceitunas con huevos y larvas del cecidómido en cajas de plástico transparente (C).

10. Análisis estadístico de los datos.

Los porcentajes de la incidencia de los agentes implicados (*B. oleae*, *P. berlesiana* y *B. dothidea*) se calcularon mediante el programa Microsoft Office Excel 2003 utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia (\%)} = (\text{N}^\circ \text{ de aceitunas infestadas} / \text{N}^\circ \text{ total de aceitunas observadas}) \times 100$$

El Test chi-cuadrado (χ^2) (Statistix 8.0) fue usado para comprobar si los valores de frecuencia obtenidos eran o no significativamente diferentes a los teóricos. El análisis se aplicó a la presencia del cecidómido *P. berlesiana* en relación al estado de picada de mosca del olivo *B. oleae* (viva y no viva) en las aceitunas, y la incidencia del Escudete *B. dothidea* en relación al daño causado por la mosca del olivo (González *et al.*, 2006).

RESULTADOS

1. Incidencia de los agentes implicados.

1.1. Mosca del olivo (*Bactrocera oleae*).

1.1.1. Incidencia de las poblaciones naturales de adultos.

La evaluación de las capturas de adultos de *B. oleae* en trampas alimenticias, durante la campaña 2010 para tres variedades del olivo demuestra que la población de mosca en esta zona fue muy baja. El número total de moscas capturadas a lo largo de la campaña 2010 fue de 495 adultos, el 42,4% en Gordal, el 44,8% en Hojiblanca y el 12,7% en Picudo. La proporción de sexos de los adultos capturados estuvo ligeramente a favor de los machos (51,7% machos, 48,2% hembras).

En la Figura 24 se observa que el número de adultos capturados durante los meses del otoño fue mayor, en comparación con los de verano (Julio y Agosto). Los máximos de capturas se registraron durante el mes de Octubre en la variedad Gordal y el mes de Noviembre en las variedades Hojiblanca y Picudo.

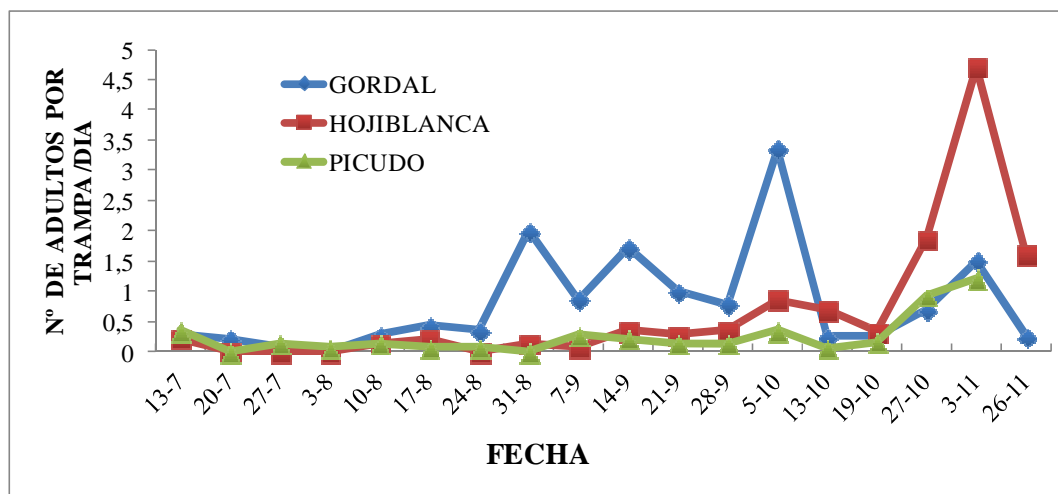


Figura 24. Captura de adultos de *Bactrocera oleae* en trampas alimenticias, en las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo durante la campaña 2010.

1.1.2. Incidencia de daños (aceitunas picadas).

La incidencia de daños por *B. oleae* en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo fue evaluada durante las campañas 2010 y 2011 mediante observaciones en campo y en muestras recogidas en laboratorio.

Los resultados de las observaciones de campo realizadas durante la campaña de 2010 quedan recogidos en la Tabla 6 y Figura 25. Las primeras aceitunas picadas fueron registradas a finales de Julio en Gordal y Picudo y a mediados de Agosto en Hojiblanca. En la variedad Gordal hubo el mayor número de aceitunas con picada de la mosca en comparación con las otras variedades. También en esta variedad se observó un incremento en el número de aceitunas picadas a partir de la primera semana de Septiembre, que alcanzó un nivel máximo (239/950 aceitunas) en la tercera semana de Octubre.

Tabla 6. Incidencia de la picada de *Bactrocera oleae* en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010.

<i>Número de aceitunas</i>						
<i>Fecha</i>	<i>GORDAL</i>		<i>HOJIBLANCA</i>		<i>PICUDO</i>	
	<i>Total observadas</i>	<i>Picada de mosca</i>	<i>Total observadas</i>	<i>Picada de mosca</i>	<i>Total observadas</i>	<i>Picada de mosca</i>
13-7	750	0	736	0	784	0
20-7	616	7	763	0	749	0
27-7	988	0	978	0	985	2
3-8	995	0	958	0	897	0
10-8	930	0	986	0	961	17
17-8	950	4	966	2	910	2
24-8	927	11	957	0	929	8
31-8	932	16	963	2	948	3
7-9	961	80	959	2	977	2
14-9	947	226	926	0	928	0
21-9	950	150	951	0	935	0
29-9	964	178	948	2	957	0
5-10	967	209	964	4	983	0
13-10	970	185	978	24	951	2
19-10	950	239	969	66	972	5
27-10	974	183	985	64	998	5
3-11	988	164	997	172	998	11
Total	15.759	1.652	15.984	338	15.862	57

De la Figura 25 se deduce que el porcentaje de aceitunas picadas aumentó durante los meses del otoño especialmente en las variedades Gordal y Hojiblanca.

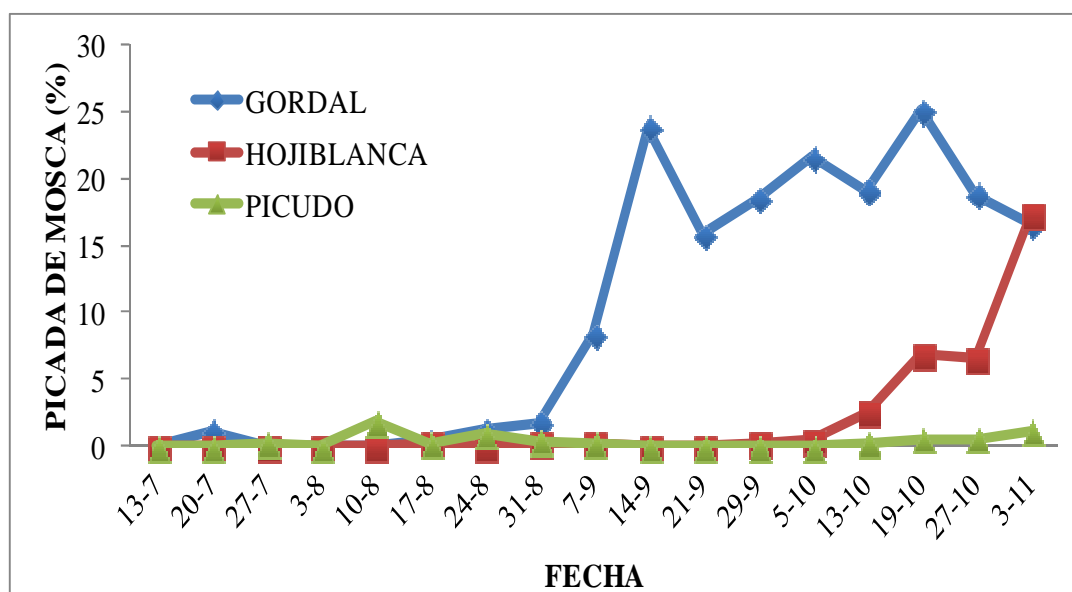


Figura 25. Porcentaje de aceitunas picadas por *Bactrocera oleae* en las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo, observaciones de campo durante la campaña 2010.

La incidencia de la mosca del olivo en aceitunas de las tres variedades fue evaluada también en laboratorio en muestras recogidas durante las campañas 2010 y 2011. Los resultados obtenidos durante la campaña 2010 muestran que el porcentaje de aceitunas picadas fue muy elevado en la variedad Gordal, bastante considerable en Hojiblanca y más bien moderado en Picudo (Tabla 7). El valor máximo de incidencia alcanzó el 64,8% de las aceitunas observadas en la variedad Gordal, mientras que en las variedades Hojiblanca y Picudo estuvo por debajo del 20% (Tabla 7).

Tabla 7 . Presencia de la picada de *Bactrocera oleae* en muestras de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante la campaña 2010 y observadas en el laboratorio.

<i>Variedad</i>	<i>Fecha</i>	<i>Total</i>	<i>Picada de mosca</i>	
			<i>Nº</i>	<i>%</i>
GORDAL	5-10	225	118	52,4
	19-10	225	146	64,9
	3-11	225	81	36,0
	26-11	225	70	31,1
Total		900	415	46,1
HOJIBLANCA	5-10	225	10	4,4
	19-10	225	11	4,9
	3-11	225	28	12,4
	26-11	225	41	18,2
Total		900	90	10,0
PICUDO	5-10	225	9	4,0
	19-10	225	24	10,7
	3-11	225	5	2,2
Total		675	38	5,6

El resultado de las observaciones del muestreo de aceitunas realizado a mediados del mes Noviembre durante la campaña 2011 indica que los porcentajes de aceituna picada registrados en esta campaña fueron inferiores a los obtenidos en el último muestreo de la campaña anterior, en fechas similares del mismo mes de Noviembre (Tabla 8). El porcentaje de aceitunas picadas por la mosca en la última fecha de recogida de la campaña 2011 se redujo 2,8 y 2,5 veces en las variedades Gordal y Hojiblanca, respectivamente, en comparación con el año 2010. En Picudo el valor obtenido no es comparable con el del año anterior debido a la considerable diferencia entre las fechas de recogida de ambos muestreos.

Tabla 8. Incidencia de la picada de *Bactrocera oleae* en una muestra de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante la campaña 2011 y observadas en el laboratorio.

<i>Variedad</i>	<i>Fecha</i>	<i>Total</i>	<i>Picada de mosca</i>	
			<i>Nº</i>	<i>%</i>
GORDAL		400	45	11,3
HOJIBLANCA	17-11	400	31	7,8
PICUDO		400	23	5,8

1.2. Cecidómido (*Prolasioptera berlesiana*).

En la Tabla 9 y Figura 26 se reflejan los datos correspondientes a la incidencia de *P. berlesiana* en las aceitunas de las observaciones de campo en la campaña 2010. Las que presentaban lesiones por la mosca fueron posteriormente examinadas en el laboratorio para verificar la presencia del mosquito (ver Materiales y Métodos apartado 3).

El cecidómido *P. berlesiana* fue detectado únicamente en el interior de la picada de *B. oleae*. Su primera aparición fue a finales de Julio en aceitunas de la variedad Gordal (Tabla 9). En esta misma variedad tuvo una incidencia perceptible durante el mes de Agosto, incrementándose de forma notable desde principios del mes de Septiembre hasta alcanzar un máximo (188/950 aceitunas) en la tercera semana de Octubre y un total de 894/15.759 de aceitunas. Por el contrario, en las variedades Hojiblanca y Picudo la incidencia del cecidómido fue muy baja, siendo sólo de 14/15.984 y 23/15.862 aceitunas, respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010.

<i>Fecha</i>	<i>Número de aceitunas</i>					
	<i>GORDAL</i>		<i>HOJIBLANCA</i>		<i>PICUDO</i>	
	<i>Total observadas</i>	<i>Cecidómido</i>	<i>Total observadas</i>	<i>Cecidómido</i>	<i>Total observadas</i>	<i>Cecidómido</i>
13-7	750	0	736	0	784	0
20-7	616	5	763	0	749	0
27-7	988	0	978	0	985	1
3-8	995	0	958	0	897	0
10-8	930	0	986	0	961	9
17-8	950	2	966	2	910	1
24-8	927	4	957	0	929	3
31-8	932	5	963	1	948	1
7-9	961	35	959	1	977	1
14-9	947	73	926	0	928	0
21-9	950	81	951	0	935	0
29-9	964	97	948	1	957	0
5-10	967	106	964	1	983	0
13-10	970	101	978	0	951	2
19-10	950	188	969	3	972	2
27-10	974	100	985	0	998	0
3-11	988	97	997	5	998	3
Total	15.759	894	15.984	14	15.862	23

La Figura 26 muestra los porcentajes de incidencia de *P. berlesiana* en aceitunas durante la campaña 2010. En la variedad Gordal se observa que la presencia de *P. berlesiana* en aceitunas fue mayor durante los meses del otoño (Septiembre - Noviembre) en comparación con los meses del verano. Por otro lado, la incidencia del mismo en las variedades Hojiblanca y Picudo fue muy escasa.

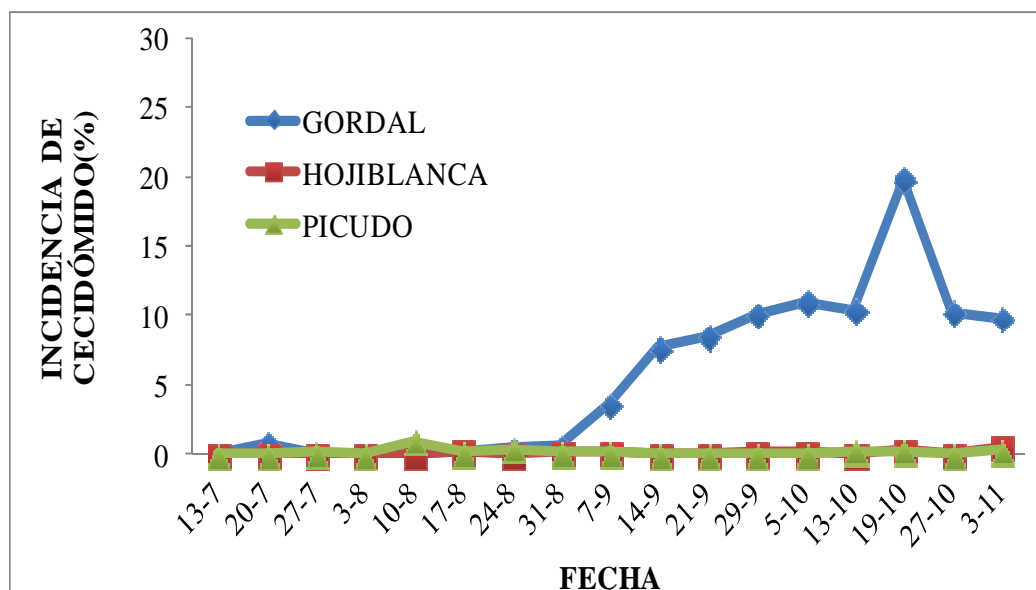


Figura 26. Porcentaje de la incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010.

Los resultados de los muestreos de aceitunas recogidas durante las campañas 2010 y 2011, procesadas en laboratorio, señalan una presencia de *P. berlesiana* bastante superior en aceitunas de la variedad Gordal en comparación con las de Hojiblanca y Picudo en las dos campañas (Tabla 10). Además, la incidencia del cecidómido en la variedad Gordal registrada en la primera semana del mes de Octubre de 2011 fue cuatro veces mayor que a la observada en la misma fecha del 2010 (Tabla 10).

Tabla 10. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en muestras de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante las campañas 2010 y 2011 y observadas en el laboratorio.

<i>Campaña</i>	<i>Variedad</i>	<i>Fecha</i>	<i>Total</i>	<i>Cecidómido</i>	
				Nº	%
2010	GORDAL	5-10	225	19	8,4
		19-10	225	20	8,9
		3-11	225	23	10,2
		26-11	225	13	5,8
	Total		900	75	8,3
	HOJIBLANCA	5-10	225	2	0,9
		19-10	225	1	0,4
		3-11	225	11	4,9
		26-11	225	3	1,3
	Total		900	17	1,9
	PICUDO	5-10	225	2	0,9
		19-10	225	3	1,3
		3-11	225	0	0,0
	Total		675	5	0,7
2011	GORDAL	26-9	194	72	37,1
		4-10	241	86	35,7
		17-11	400	17	4,3
	Total		835	175	20,9
	HOJIBLANCA	17-11	400	11	2,8
	PICUDO	17-11	400	6	1,5

1.3. Escudete (*Botryosphaeria dothidea*).

La incidencia del Escudete en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo fue evaluada durante la campaña de 2010 mediante observaciones de campo y muestras de aceitunas procesadas en laboratorio.

Las observaciones de campo mostraron que las primeras aceitunas con síntomas de Escudete se encontraban a finales de Julio en la variedad Gordal. En esta misma variedad se obtuvo la mayor incidencia de la enfermedad (Tabla 11).

Tabla 11. Incidencia del Escudete (*Botryosphaeria dothidea*) en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010.

<i>Fecha</i>	<i>Número de aceitunas</i>					
	<i>GORDAL</i>		<i>HOJIBLANCA</i>		<i>PICUDO</i>	
	<i>Total observadas</i>	<i>Escudete</i>	<i>Total observadas</i>	<i>Escudete</i>	<i>Total observadas</i>	<i>Escudete</i>
13-7	750	0	736	0	784	0
20-7	616	7	763	0	749	0
27-7	988	0	978	0	985	1
3-8	995	0	958	0	897	0
10-8	930	0	986	0	961	11
17-8	950	2	966	2	910	1
24-8	927	7	957	0	929	5
31-8	932	8	963	1	948	1
7-9	961	50	959	1	977	1
14-9	947	115	926	0	928	0
21-9	950	118	951	0	935	0
29-9	964	128	948	1	957	0
5-10	967	166	964	1	983	0
13-10	970	155	978	0	951	2
19-10	950	231	969	3	972	2
27-10	974	183	985	0	998	0
3-11	988	114	997	6	998	3
Total	15.759	1.284	15.984	15	15.862	27

La evolución de la enfermedad fue muy lenta durante los meses del verano (Julio y Agosto) y fue a partir del mes de Septiembre cuando experimentó un incremento considerable alcanzando su máximo (24,3%) en la segunda mitad del mes de Octubre en la variedad Gordal (Figura 27).

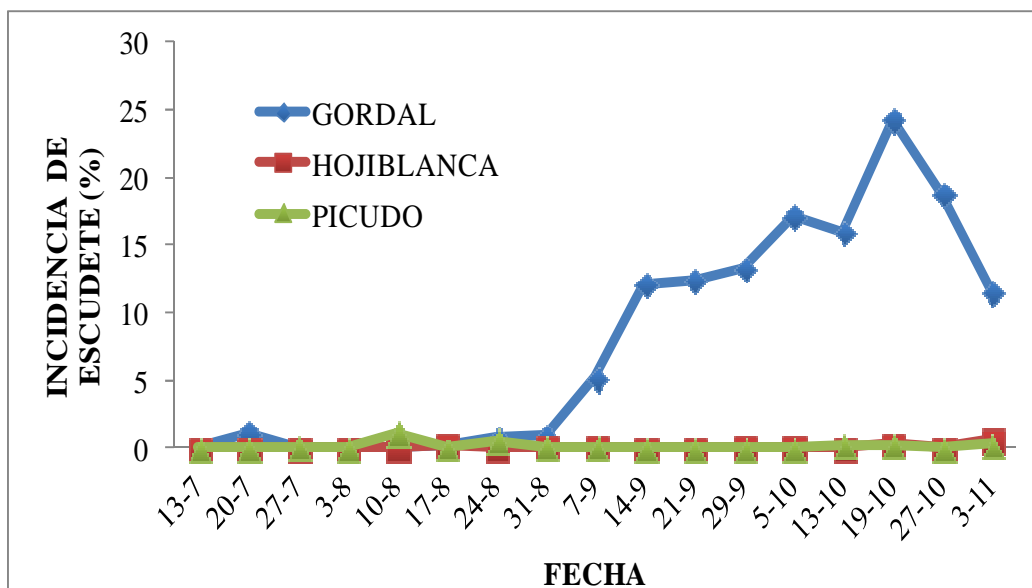


Figura 27. Porcentaje de incidencia del Escudete (*Botryosphaeria dothidea*) en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el campo durante la campaña 2010.

Los datos que corresponden a la incidencia de Escudete en los muestreos procesados en laboratorio reflejan la misma tendencia observada en campo. En cuanto a la comparación de las variedades, de nuevo es Gordal la que presentó mayor incidencia. Los valores de incidencia y el porcentaje máximo obtenidos se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Incidencia del Escudete (*Botryosphaeria dothidea*) en muestras de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante la campaña 2010 y observadas en el laboratorio.

<i>Variedad</i>	<i>Fecha</i>	<i>Total</i>	<i>Escudete</i>	
			<i>Nº</i>	<i>%</i>
GORDAL	5-10	225	43	19,1
	19-10	225	56	24,9
	3-11	225	46	20,4
	26-11	225	44	19,6
Total		900	189	21,0
HOJIBLANCA	5-10	225	12	5,3
	19-10	225	11	4,9
	3-11	225	20	8,9
	26-11	225	16	7,1
Total		900	59	6,6
PICUDO	5-10	225	9	4,0
	19-10	225	9	4,0
	3-11	225	22	9,8
Total		675	40	5,9

2. Interacción mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) - cecidómido (*Prolasioptera berlesiana*).

2.1. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picada natural de *Bactrocera oleae*.

Durante las observaciones de campo realizadas semanalmente en la campaña de 2010, las aceitunas picadas o con síntomas de Escudete fueron recogidas, trasladadas al laboratorio y examinadas al microscopio estereoscópico para comprobar la presencia del cecidómido (*P. berlesiana*).

En la Tabla 13 se han recogido los resultados obtenidos de las observaciones realizadas. La presencia de *P. berlesiana* en aceitunas siempre estuvo relacionada con la picada de *B. oleae*. La variedad Gordal tuvo el mayor número de aceitunas picadas en más de la mitad de las cuales estuvo presente el cecidómido (54,1% N= 894/1.652). Las variedades Hojiblanca y Picudo tuvieron una incidencia mucho más baja en picadas de *B. oleae*, con una presencia del cecidómido inferior en ellas (4,1% N=14/338 y 40,3% N=23/57, respectivamente) a la observada en la variedad Gordal.

Cabe mencionar que el cecidómido se encontraba siempre en aceitunas picadas por *B. oleae* y/o con síntomas del Escudete. En el interior de algunas de las aceitunas picadas se observaron dos huevos, uno de la mosca del olivo y el otro, cuatro veces más pequeño, el del cecidómido (Figura 28 A y B, respectivamente). En algunos casos se ha visto más de una larva o pupa en el interior o fuera de una picada de mosca donde el crecimiento del hongo era visible. Además, en un número muy reducido de picadas se observaron larvas del cecidómido junto a una pupa de *B. oleae* (Figura 28 C).

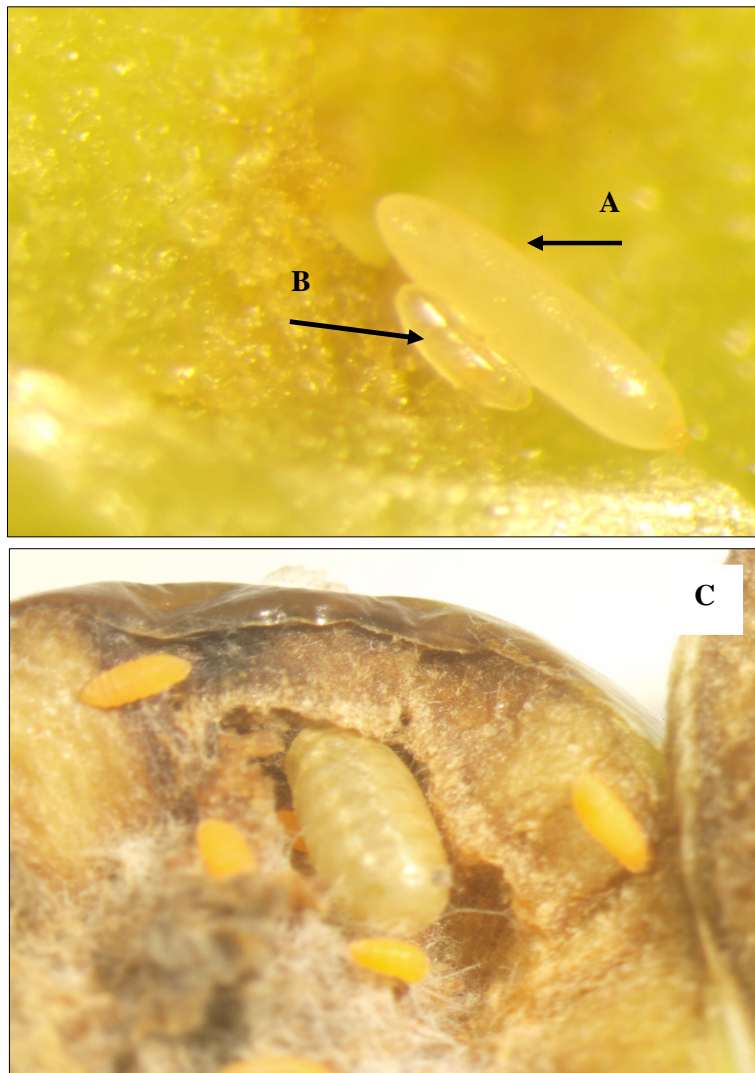


Figura 28. Huevo de la mosca del olivo (A) junto a un huevo del cecidómido (B) en el interior de la picada. Larvas de *Prolasioptera berlesiana* junto a una pupa de *Bactrocera oleae* en el interior de la galería (C).

Tabla 13. Presencia de *Prolasioptera berlesiana* en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo con picadas de mosca observadas en el campo durante la campaña 2010.

Fecha	Número de aceitunas								
	GORDAL			HOJIBLANCA			PICUDO		
	Picada de mosca	Cecidómido		Picada de mosca	Cecidómido		Picada de mosca	Cecidómido	
	Nº	Nº	%	Nº	Nº	%	Nº	Nº	%
13-7	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0
20-7	7	5	71,4	0	0	0,0	0	0	0,0
27-7	0	0	0,0	0	0	0,0	2	1	50,0
3-8	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0
10-8	0	0	0,0	0	0	0,0	17	9	52,9
17-8	4	2	50,0	2	2	100	2	1	50,0
24-8	11	4	36,3	0	0	0,0	8	3	37,5
31-8	16	5	31,2	2	1	50,0	3	1	33,3
7-9	80	35	43,7	2	1	50,0	2	1	50,0
14-9	226	73	32,3	0	0	0,0	0	0	0,0
21-9	150	81	54,0	0	0	0,0	0	0	0,0
29-9	178	97	54,4	2	1	50,0	0	0	0,0
5-10	209	106	50,7	4	1	25,0	0	0	0,0
13-10	185	101	54,5	24	0	0,0	2	2	100
19-10	239	188	78,6	66	3	4,5	5	2	40,0
27-10	183	100	54,6	64	0	0,0	5	0	0,0
3-11	164	97	59,1	172	5	2,9	11	3	27,2
Total	1.652	894	54,1	338	14	4,1	57	23	40,3

La relación entre aceitunas picadas por *B. oleae* y la incidencia de *P. berlesiana* en ellas para las tres variedades queda reflejada en la Figura 29 C, D y E. En la Figura 29 A se presentan también los datos climáticos (temperatura y humedad relativa) registrados en la zona durante el periodo de las observaciones, así como las capturas de adultos (hembras) de *B. oleae* (Figura 29 B). Se observa que las condiciones de temperaturas suaves y alta humedad relativa (Septiembre, Octubre y principios de Noviembre) favorecen la incidencia de *B. oleae* y *P. berlesiana* con respecto a los meses del verano. Además, se aprecia una correlación progresiva entre el número de adultos de *B. oleae* capturados y la incidencia de aceitunas picadas, así como entre estas últimas y la presencia de *P. berlesiana*. Esta relación es más evidente en la variedad Gordal (Figura 29 C), pudiéndose constatar la presencia del cecidómido en el interior del orificio de puesta de *B. oleae* con las primeras picadas de la mosca. El periodo de presencia del cecidómido coincide con los periodos de vuelo de la mosca de olivo, mientras que los máximos de su incidencia coinciden con los máximos de ataque por la misma.

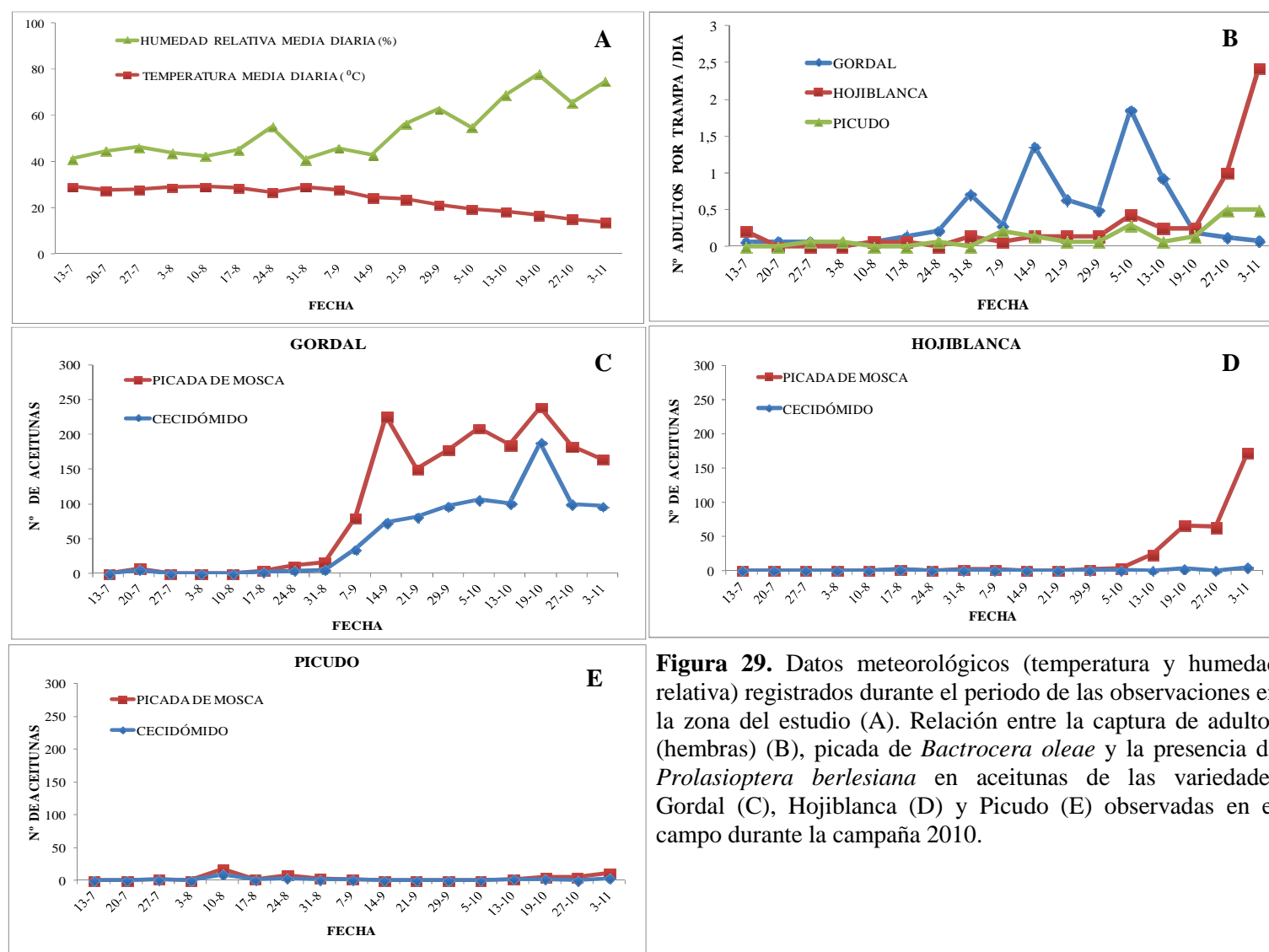


Figura 29. Datos meteorológicos (temperatura y humedad relativa) registrados durante el periodo de las observaciones en la zona del estudio (A). Relación entre la captura de adultos (hembras) (B), picada de *Bactrocera oleae* y la presencia de *Prolasioptera berlesiana* en aceitunas de las variedades Gordal (C), Hojiblanca (D) y Picudo (E) observadas en el campo durante la campaña 2010.

Durante la campaña 2009 se recogieron muestras de aceitunas que presentaban lesiones de picadas de mosca y síntomas de Escudete que fueron observadas en laboratorio. En la Tabla 14 se exponen los datos de la incidencia de *P. berlesiana* en estas aceitunas en las tres variedades. *Prolasioptera berlesiana* se encontró en más del 22% de las aceitunas picadas de la variedad Gordal, casi tres veces más que en Hojiblanca y Picudo.

Tabla 14. Presencia del *Prolasioptera berlesiana* en picadas de mosca en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante la campaña 2009 y observadas en el laboratorio.

<i>Variedad</i>	<i>Fecha</i>	<i>Total picada</i>	<i>Cecidómido</i>	
		<i>Nº</i>	<i>Nº</i>	<i>%</i>
GORDAL	6-10	17	4	23,5
	15-10	17	1	5,8
	20-10	121	26	21,4
	23-10	125	19	15,2
	27-10	260	42	16,1
	10-11	373	115	30,8
	Total	913	207	22,6
HOJIBLANCA	6-10	21	5	23,8
	15-10	41	8	19,5
	20-10	166	8	4,8
	23-10	267	11	4,1
	27-10	250	10	4,0
	10-11	510	56	10,9
	Total	1.255	98	7,8
PICUDO	6-10	15	0	0,0
	15-10	37	2	5,4
	20-10	35	3	8,5
	23-10	13	2	15,3
	27-10	33	0	0,0
	10-11	55	6	10,9
	Total	188	13	6,9

En 2010 la incidencia de *P. berlesiana* en picada de mosca fue similar en las variedades de Gordal y Hojiblanca y algo menor en la variedad Picudo, si bien en ningún caso superaron el 20% (Tabla 15). Al final de la campaña 2011 se registró, en general, una

presencia relativamente alta del cecidómido en las tres variedades. En la variedad Gordal, tuvo una incidencia constante de alrededor del 37% durante los meses de Octubre y Noviembre de esta campaña 2011.

Tabla 15. Presencia de *Prolasioptera berlesiana* en picadas de mosca de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante las campañas 2010 y 2011 y observadas en el laboratorio.

<i>Campaña</i>	<i>Variedad</i>	<i>Fecha</i>	<i>Total picada</i>	<i>Cecidómido</i>	
			<i>Nº</i>	<i>Nº</i>	<i>%</i>
2010	GORDAL	5-10	118	19	16,1
		19-10	146	20	13,7
		3-11	81	23	28,4
		26-11	70	13	18,5
	Total		415	75	18,0
	HOJIBLANCA	5-10	10	2	20,0
		19-10	11	1	9,0
		3-11	28	11	39,2
		26-11	41	3	7,3
	Total		90	17	18,8
	PICUDO	5-10	9	2	22,2
		19-10	24	3	12,5
		3-11	5	0	0,0
	Total		38	5	13,1
2011	GORDAL	26-9	194	72	37,1
		4-10	241	86	35,6
	Total		435	158	38,7
	GORDAL		45	17	37,7
	HOJIBLANCA	17-11	31	11	35,4
	PICUDO		23	6	26,0

2.2. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picada de mosca viva y no viva.

Las aceitunas recogidas durante las campañas 2009, 2010 y 2011 se clasificaron, atendiendo al estado de picada de la mosca *B. oleae*, en aceitunas con picada viva (presencia de huevo, larva, pupa y galería abandonada) y aceitunas con picada no viva. En cada grupo se procedió a comprobar la incidencia de *P. berlesiana*. Los resultados de este estudio señalan alta presencia del cecidómido en las picadas no vivas en todas las variedades (Tabla 16). El

análisis estadístico mediante el test chi-cuadrado (χ^2) muestra que esta incidencia es significativamente mayor ($P<0.0001$) en comparación con las picadas vivas.

Tabla 16. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picada viva y no viva de *Bactrocera oleae* en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante las campañas 2009, 2010 y 2011 y observadas en el laboratorio.

Campaña	Variedad	Total picada	Picada viva		Picada no viva		Total con cecidómido	
			Nº	Con cecidómido	Nº	Con cecidómido	Nº	%
2009	GORDAL	913	584	8	329	199	207	22,6
	HOJIBLANCA	1255	943	11	312	87	98	7,8
	PICUDO	188	145	0	43	13	13	6,9
Total		2.356	1.672	19	684	299	318	13,5
2010	GORDAL	415	144	6	271	69	75	18,0
	HOJIBLANCA	90	53	0	37	17	17	18,8
	PICUDO	38	29	0	9	5	5	13,1
Total		543	226	6	317	91	97	17,8
2011	GORDAL	435	277	6	158	152	158	36,3

En la Figura 30 se observa que los mayores porcentajes de incidencia de *P. berlesiana* fueron obtenidos en picadas no vivas de mosca, siendo en la campaña 2011 cuando se registró el porcentaje más alto (96,2%) de incidencia del cecidómido en la variedad Gordal.

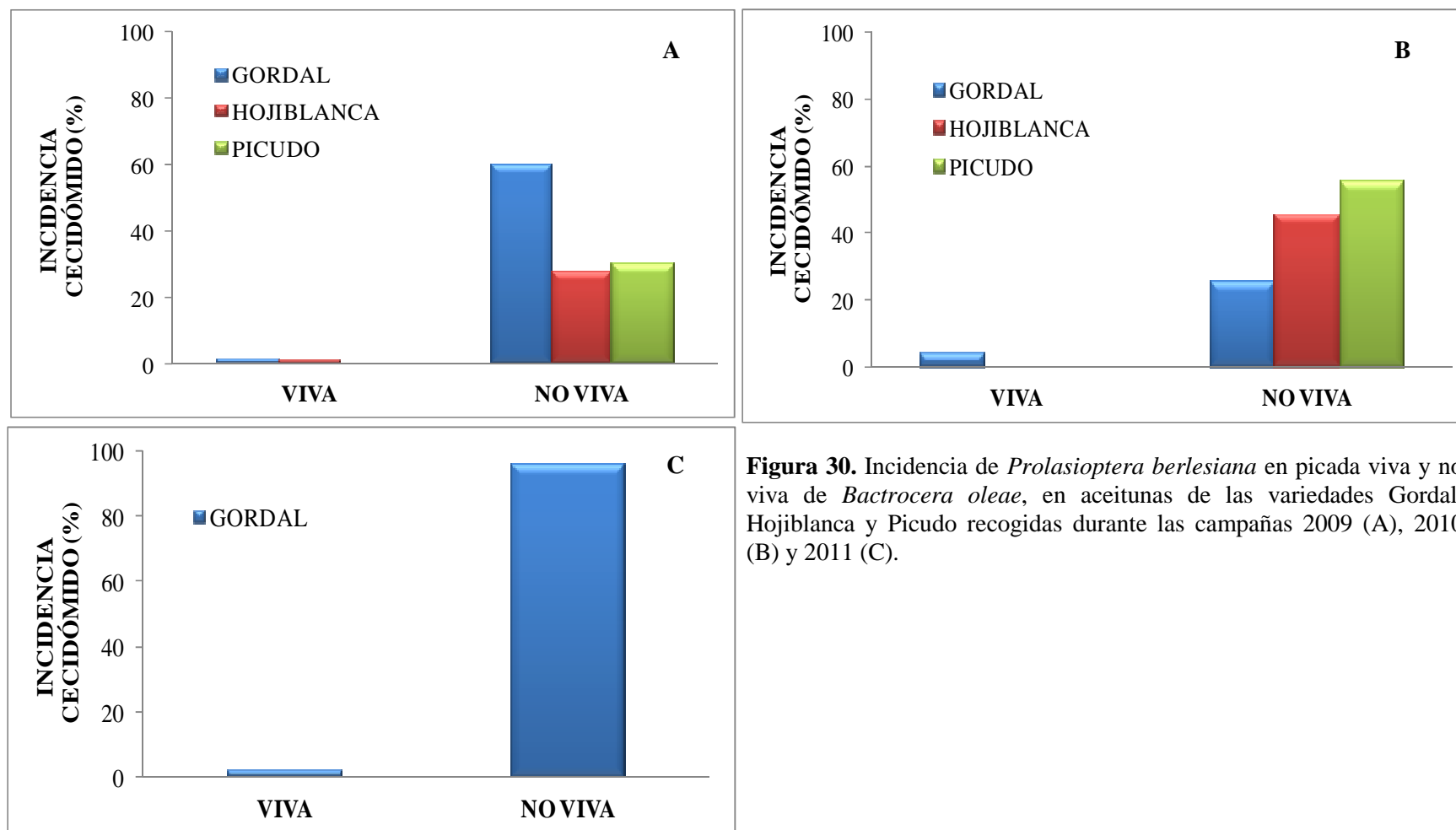


Figura 30. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picada viva y no viva de *Bactrocera oleae*, en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante las campañas 2009 (A), 2010 (B) y 2011 (C).

2.3. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picadas artificiales simulando la picada de mosca (PSM).

Con el objetivo de comprobar si el cecidómido *P. berlesiana* acude a heridas falsas (sin huevo) de la mosca del olivo, se realizaron en campo dos experimentos donde se efectuaron picadas artificiales simulando la picada de mosca (PSM). El primero se realizó a finales del mes de Julio y el segundo a finales de Agosto de 2010. Las picadas artificiales se efectuaron en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo.

La alta incidencia de *P. berlesiana* observada en estas picadas artificiales confirma el aprovechamiento de las heridas recientes para depositar sus huevos sin requerir la presencia del huevo de *B. oleae*. Los porcentajes más altos de incidencia del cecidómido se registraron en el experimento realizado en Agosto en las tres variedades (Tablas 17,18 y19). La variedad Gordal tuvo los mayores porcentajes de incidencia alcanzando el 50% de aceitunas picadas (Tabla 17), mientras que en Hojiblanca y Picudo fueron inferiores al 28% (Tablas 18 y19). La incidencia del cecidómido en el testigo (picada natural de *B. oleae*) fue muy baja, debido a la poca presencia de picada de mosca.

Tabla 17. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picadas naturales de *Bactrocera oleae* y artificiales simulando la picada de mosca (PSM) en aceitunas de la variedad Gordal, observadas en el campo durante la campaña 2010.

**Ensayo	Fecha	Picada natural de mosca			Picada artificial (PSM)		
		Total	Cecidómido		Total	Cecidómido	
			Nº	%		Nº	%
A	3-8	0	0	0,0	489	0	0,0
	10-8	0	0	0,0		36	7,3
	17-8	0	0	0,0		32	6,5
	24-8	0	0	0,0		23	4,7
	31-8	1	1	100		0	0,0
	7-9	3	2	66,6		7	1,4
	14-9	12	9	75,0		11	2,2
	21-9	4	2	50,0		1	0,2
	29-9	4	2	50,0		6	1,2
	5-10	3	3	100		3	0,6
	13-10	4	4	100		3	0,6
Total		31	23	74,1	489	122	24,9
B	7-9	0	0	0,0	554	0	0,0
	14-9	11	11	100		256	46,2
	21-9	18	14	77,7		10	1,8
	29-9	19	12	63,1		9	1,6
	5-10	5	2	40,0		1	0,1
	13-10	9	7	77,7		1	0,1
Total		62	46	74,1	554	277	50,0

** Fechas de los experimentos: 27 de Julio (A) y 31 de Agosto (B).

Tabla 18. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picadas naturales de *Bactrocera oleae* y artificiales simulando la picada de mosca (PSM) en aceitunas de la variedad Hojiblanca, observadas en el campo durante la campaña 2010.

**Ensayo	Fecha	Picada natural de mosca			Picada artificial (PSM)		
		Total	Cecidómido		Total	Cecidómido	
			Nº	%		Nº	%
A	3-8	0	0	0,0	586	0	0,0
	10-8	0	0	0,0		7	1,1
	17-8	0	0	0,0		2	0,3
	24-8	0	0	0,0		2	0,3
	31-8	0	0	0,0		1	0,1
	7-9	0	0	0,0		0	0,0
	14-9	0	0	0,0		0	0,0
	21-9	0	0	0,0		0	0,0
	29-9	0	0	0,0		0	0,0
	5-10	0	0	0,0		0	0,0
	13-10	0	0	0,0		0	0,0
Total		0	0	0,0	586	12	2,0
B	7-9	0	0	0,0	609	0	0,0
	14-9	0	0	0,0		121	19,8
	21-9	0	0	0,0		34	5,5
	29-9	0	0	0,0		11	1,8
	5-10	0	0	0,0		2	0,3
	13-10	0	0	0,0		1	0,1
Total		0	0	0,0	609	169	27,7

** Fechas de los experimentos: 27 de Julio (A) y 31 de Agosto (B).

Tabla 19. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picadas naturales de *Bactrocera oleae* y artificiales simulando la picada de mosca (PSM) en aceitunas de la variedad Picudo, observadas en el campo durante la campaña 2010.

**Ensayo	Fecha	Picada natural de mosca			Picada artificial (PSM)		
		Total	Cecidómido		Total	Cecidómido	
			Nº	%		Nº	%
A	3-8	0	0	0,0	544	0	0,0
	10-8	0	0	0,0		2	0,3
	17-8	0	0	0,0		2	0,3
	24-8	0	0	0,0		0	0,0
	31-8	0	0	0,0		0	0,0
	7-9	0	0	0,0		0	0,0
	14-9	0	0	0,0		0	0,0
	21-9	0	0	0,0		0	0,0
	29-9	0	0	0,0		0	0,0
	5-10	0	0	0,0		0	0,0
	13-10	0	0	0,0		0	0,0
Total		0	0	0,0	544	4	0,7
B	7-9	0	0	0,0	600	0	0,0
	14-9	0	0	0,0		18	3,0
	21-9	0	0	0,0		9	1,5
	29-9	0	0	0,0		4	0,6
	5-10	4	3	75,0		0	0,0
	13-10	0	0	0,0		0	0,0
Total		4	3	75,0	600	31	5,1

** Fechas de los experimentos: 27 de Julio (A) y 31 de Agosto (B).

En la Figura 31 A se recogen las condiciones climatológicas (temperatura y humedad relativa) registradas en la zona durante el periodo de los experimentos. El mayor número de aceitunas con presencia del cecidómido fue obtenido en el experimento realizado a finales del mes Agosto, cuando las temperaturas bajaron ligeramente y la humedad relativa era más alta.

La relación entre picadas naturales de *B. oleae* y artificiales (PSM) y la presencia de *P. berlesiana* en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo se muestra en la Figura 31 B, C y D, respectivamente. La presencia del cecidómido en picadas artificiales fue mayor en comparación con la picada natural.

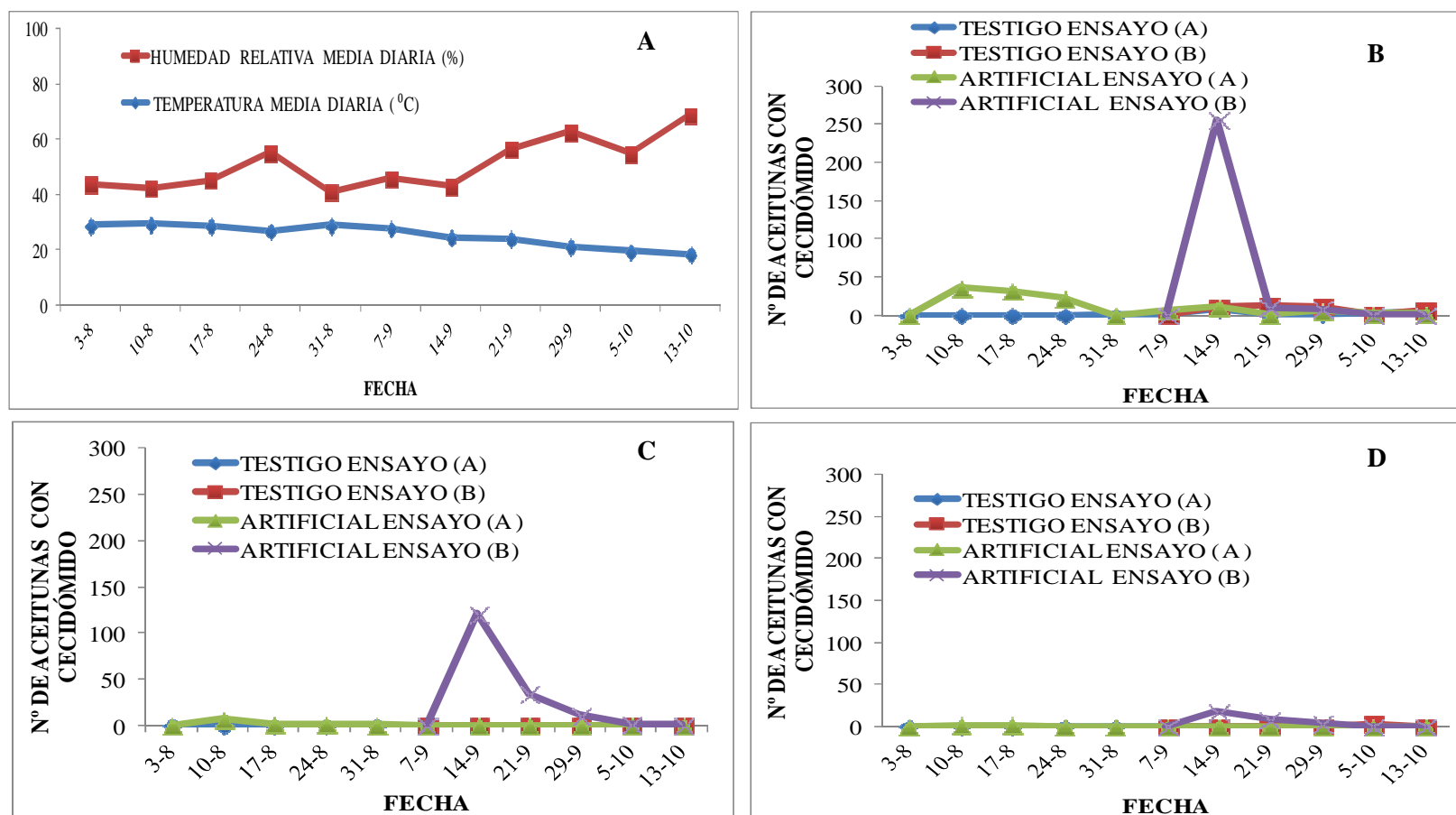


Figura 31. Datos meteorológicos (temperatura y humedad relativa) registrados durante el periodo de los ensayos (A). Relación entre dos tipos de picadas (natural de *Bactrocera oleae* y artificial simulando la picada de mosca) y la presencia de *Prolasioptera berlesiana* en aceitunas de las variedades Gordal (B), Hojiblanca (C) y Picudo (D), observadas en el campo durante la campaña 2010. Fechas de los ensayos: 27 de Julio (A) y 31 de Agosto (B).

2.4. Efecto del tipo de picada artificial sobre la incidencia de *Prolasioptera berlesiana*.

Se efectuaron dos tipos de heridas artificiales en aceitunas de la variedad Gordal, el primer tipo, picadas simulando la de la mosca (PSM) y el segundo, picadas irregulares (PIR).

Los datos expuestos en la Tabla 20 reflejan que durante las 48 horas *P. berlesiana* fue detectado con mayor frecuencia (40,2 %) en picadas artificiales simulando la picada de *B. oleae* (PSM). Sin embargo, en las picadas irregulares (PIR) no fue observado.

Tabla 20. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en dos tipos de picada artificial en aceitunas de la variedad Gordal a las 48 horas después de realizar las picadas artificiales.

**Tipo de picada	Total Observadas	Total Picada	Con cecidómido	
			Nº	%
Picada natural (de mosca)	274	7	4	57,1
PSM	400	400	161	40,2
PIR	406	406	0	0,0

** (PSM) picada artificial simulando la picada de mosca, (PIR) picada irregular.

Sin embargo, en las aceitunas con picadas artificiales irregulares (PIR) y recogidas en intervalos de tiempo semanales, *P. berlesiana* apareció a los 14 días después y alcanzó su máxima incidencia (3,1%) 21 días después (Tabla 21).

Tabla 21. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picadas artificiales irregulares (PIR) durante recogidas periódicas de aceitunas de la variedad Gordal.

<i>Periodo de observación por Día</i>	<i>Picada natural de mosca</i>			<i>Picada artificial (PIR)</i>		
	<i>Total</i>	<i>Cecidómido</i>		<i>Total</i>	<i>Cecidómido</i>	
		<i>Nº</i>	<i>%</i>		<i>Nº</i>	<i>%</i>
7	20	12	60,0	882	0	0
14	9	6	66,6		22	2,4
21	8	8	100		27	3,1
28	3	2	66,6		8	0,9
Total	40	28	70,0	882	57	6,4

Se ha detectado que el cecidómido realizó puestas tanto en las heridas PSM frescas (de 0 a 24 horas) como en otras ya no tan frescas (de 24 a 48 horas). Así, en la Tabla 22 se observa que a las 48 horas el porcentaje de picadas con huevos y larvas del cecidómido era el doble que el registrado a las 24 horas y en muchas de las cuales se encontró en estado de huevo.

Tabla 22. Puestas de *Prolasioptera berlesiana* en picadas artificiales PSM realizadas en aceitunas de la variedad Gordal tras 24 y 48 horas.

		<i>24h.</i>					<i>48h.</i>				
		<i>Total picada</i>		<i>Cecidómido</i>			<i>Total picada</i>		<i>Cecidómido</i>		
		<i>Nº</i>	<i>%</i>	<i>Estado</i>	<i>Nº</i>	<i>%</i>			<i>Nº</i>	<i>%</i>	<i>Estado</i>
PSM	130	31	23,8	Huevo	23	74,1	270	130	48,1		Huevo
				Larva	8	25,8					Larva

(PSM) picada artificial simulando la picada de mosca.

2.5. Desarrollo del *Prolasioptera berlesiana* bajo condiciones controladas.

A partir de picadas artificiales (PSM) en aceitunas de la variedad Gordal, se obtuvieron huevos de *P. berlesiana* que fueron recogidos 24 horas después de realizar la picada. En total se incubaron en condiciones del insectario 74 huevos que fueron revisados diariamente.

En las condiciones del insectario, *P. berlesiana* completó su desarrollo hasta el estado adulto en un promedio de 15,5 días (Tabla 23). En esta misma tabla se reflejan también los tiempos medios de duración del desarrollo y el intervalo en días de cada uno de los estados, asimismo en la Figura 32 se presentan imágenes de estos estados.

Tabla 23. Duración promedio en días de las diferentes fases de desarrollo y total del ciclo de vida del cecidómido *Prolasioptera berlesiana* en condiciones de insectario.

<i>Estado de desarrollo</i>	<i>Intervalo</i>	<i>Tiempo de desarrollo</i>
Huevo	1 – 2	1,7
Larva	7 – 9	7,5
Pupa	6 – 7	6,4
Total	14 –17	15,5



Figura 32. Fases de desarrollo del cecidómido *Prolasioptera berlesiana*. Huevo (A), Estados larvarios (B), Pupa (C), Adulto (D).

3. Interacción mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) y Escudete (*Botryosphaeria dothidea*).

3.1. Incidencia del Escudete (*Botryosphaeria dothidea*) en las picadas de mosca (*Bactrocera oleae*).

Los datos de las observaciones de campo realizadas durante la campaña 2010 para evaluar la incidencia del hongo *B. dothidea* en picadas de mosca en ausencia del cecidómido *P. berlesiana* se recogen en la Tabla 24 y en la Figura 33. Estos resultados sólo son evidentes en la variedad Gordal donde se obtuvo un número considerable de aceitunas con picadas de mosca. En la variedad Hojiblanca las aceitunas picadas aumentaron al final de la campaña, pero sólo se observó el hongo en un único caso, mientras que en la variedad Picudo no se pudo apreciar ningún resultado debido al nivel muy bajo de picadas (Tabla 24).

Muchas de las aceitunas picadas que no tenían presencia del cecidómido mostraron síntomas de Escudete (Tabla 24 y Figura 33); no obstante, cabe mencionar que el cecidómido pudo estar en el interior de las picadas y luego abandonarlas sin dejar rastro.

Tabla 24. Incidencia de *Botryosphaeria dothidea* (Escudete) en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo con picada de mosca en ausencia del cecidómido, observadas en campo durante la campaña 2010.

Fecha	GORDAL				HOJIBLANCA				PICUDO			
	Picada		Escudete		Picada		Escudete		Picada		Escudete	
	Total	Sin cecidómido	Nº	%	Total	Sin cecidómido	Nº	%	Total	Sin cecidómido	Nº	%
13-7	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0
20-7	7	2	2	100	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0
27-7	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	2	1	0	0,0
3-8	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0
10-8	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	17	8	2	25,0
17-8	4	2	0	0,0	2	0	0	0,0	2	1	0	0,0
24-8	11	7	3	42,8	0	0	0	0,0	8	5	2	40,0
31-8	16	11	3	27,2	2	1	0	0,0	3	2	0	0,0
7-9	80	45	15	33,3	2	1	0	0,0	2	1	0	0,0
14-9	226	153	42	27,4	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0
21-9	150	69	37	53,6	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0
29-9	178	81	31	38,2	2	1	0	0,0	0	0	0	0,0
5-10	209	103	60	58,2	4	3	0	0,0	0	0	0	0,0
13-10	185	84	54	64,2	24	24	0	0,0	2	0	0	0,0
19-10	239	51	43	84,3	66	63	0	0,0	5	3	0	0,0
27-10	183	83	78	93,9	64	64	0	0,0	5	5	0	0,0
3-11	164	67	17	25,3	172	167	1	0,6	11	8	0	0,0
Total	1.652	758	385	50,7	338	324	1	0,3	57	34	4	11,7

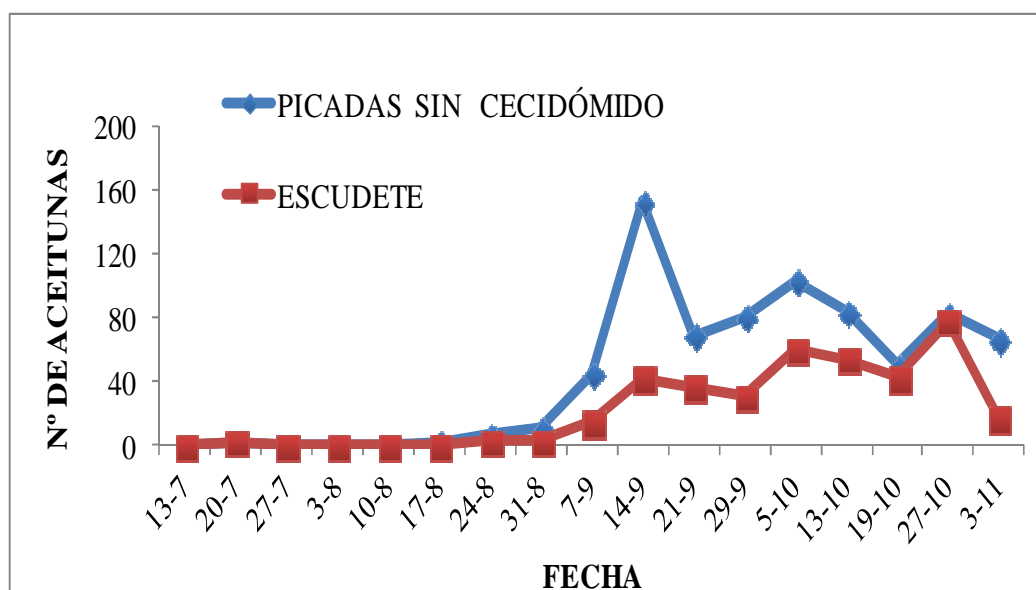


Figura 33. Efecto de la picada de *Bactrocera oleae* (en ausencia del cecidómido) en la incidencia de *Botryosphaeria dothidea* (Escudete) en aceitunas de la variedad Gordal observadas en el campo durante la campaña 2010.

En muestras de aceitunas recogidas durante la campaña 2010 y observadas en laboratorio (ver Materiales y Métodos apartado 2 y 3) se comparó la incidencia del Escudete en aceitunas picadas de mosca en ausencia de *P. berlesiana* y aceitunas que no fueron picadas por la mosca. Los resultados mostraron la misma tendencia a la observada en campo, donde en la variedad Gordal se registró una mayor incidencia de Escudete en picadas sin presencia del cecidómido en comparación con las otras dos variedades (Tabla 25). Así mismo, se observaron síntomas de esta enfermedad en un pequeño número de aceitunas que no habían sido picadas por la mosca (Tabla 25).

Tabla 25. Incidencia de *Botryosphaeria dothidea* (Escudete) en aceitunas con picadas de mosca sin cecidómido y en aceitunas sin picada en muestras recogidas durante la campaña 2010.

Variedad	Nº de aceitunas observadas	Picada de mosca sin cecidómido			Sin picada de mosca		
		Nº	Con Escudete	%	Nº	Con Escudete	%
GORDAL	900	340	93	27,3	485	21	4,3
HOJIBLANCA	900	73	6	8,2	810	36	4,4
PICUDO	675	33	3	9,0	637	32	5,0
Total	2.475	446	102	22,8	1932	89	4,6

El test chi-cuadrado (χ^2) indicó que la incidencia del Escudete en picadas de mosca sin presencia del cecidómido fue significativamente mayor ($P<0.0001$) que en las aceitunas sin picada en la variedad Gordal. Sin embargo, en las variedades Hojiblanca y Picudo no se alcanzaron niveles de significación.

3.2. Detección del hongo *Botryosphaeria dothidea* en *Bactrocera oleae*.

Se llevó a cabo la detección de *B. dothidea* en los estados inmaduros (huevo, larva y pupa) y adultos (hembras) de la mosca *B. oleae*. Para ello se realizaron aislamientos en medio de cultivo PDA ácido, tanto de la superficie externa como el interior del cuerpo de los ejemplares.

En los aislamientos realizados, el hongo *B. dothidea* sólo fue detectado en la superficie externa del adulto (hembra). En la Tabla 26 se muestra que alrededor del 74% de los adultos hembras de la mosca llevaban en la superficie de su cuerpo este hongo. Además, éste fue detectado en los adultos hembras independientemente de la variedad en la que fueron capturadas Gordal, Hojiblanca o Picudo.

La identidad del hongo aislado de los adultos hembras de *B. oleae* fue confirmada mediante técnicas moleculares de PCR.

Tabla 26. Frecuencia de aislamiento de *Botryosphaeria dothidea* en adultos (hembras) de *Bactrocera oleae*.

<i>Adultos (hembras) de B. oleae</i>							
<i>Variedad</i>	<i>Total capturadas</i>	<i>De la superficie externa</i>			<i>Del interior del cuerpo</i>		
		<i>Nº</i>	<i>B. dothidea</i>	<i>%</i>	<i>Nº</i>	<i>B. dothidea</i>	<i>%</i>
Gordal	143	74	62	83,7	69	0	0,0
Hojiblanca	252	130	100	76,9	122	0	0,0
Picudo	95	51	28	54,9	44	0	0,0
Total	490	255	190	74,5	235	0	0,0

4. Interacción *Bactrocera oleae* - *Prolasioptera berlesiana* - *Botryosphaeria dothidea*.

4.1. Incidencia del *Prolasioptera berlesiana* y *Botryosphaeria dothidea* en aceitunas con picada natural de mosca (*Bactrocera oleae*).

La incidencia de *P. berlesiana* y *B. dothidea* en picadas de mosca fue evaluada mediante observaciones de campo y recogida de muestras de aceitunas en las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo.

Las observaciones de campo, así como las realizadas en las muestras procesadas en laboratorio, indican una correlación positiva entre la incidencia de picadas de mosca, la presencia del cecidómido y el desarrollo del Escudete (Tabla 27 y Figura 34). Esta relación fue consistente en las tres campañas en las que se realizaron las evaluaciones y en las tres variedades estudiadas. La incidencia de los tres agentes fue distinta entre variedades. Así, en la variedad Gordal fue donde hubo una mayor presencia de los agentes implicados, y quedó bien reflejada una presunta interacción entre los mismos (Figura 34 A). En las variedades Hojiblanca y Picudo se vió también la misma tendencia, pero la poca incidencia de picadas de mosca no la hizo tan marcada (Figura 34 B y C, respectivamente).

Un resultado de esta investigación que debe ser destacado es la presencia del hongo *B. dothidea* en todas las picadas de mosca donde se encontró el cecidómido (Tabla 27).

Tabla 27. Incidencia del Escudete en aceitunas picadas de *Bactrocera oleae* en función de la incidencia del cecidómido *Prolasioptera berlesiana* en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo, obsevadas en campo y recogidas durante las campañas 2009, 2010 y 2011.

Campaña	Variedad	Total Picada	Con Escudete y picada de mosca		Con cecidómido		Con cecidómido y Escudete	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
2009	GORDAL	913	376	41,1	207	22,6	207	100
	HOJIBLANCA	1.255	335	26,6	98	7,8	98	100
	PICUDO	188	42	22,3	13	6,9	13	100
Total		2.356	753	31,9	318	13,5	318	100
2010	GORDAL	2.067	1.447	70,0	969	46,8	969	100
	HOJIBLANCA	428	38	8,8	31	7,2	31	100
	PICUDO	95	35	36,8	28	29,4	28	100
Total		2.590	1.520	58,6	1.028	39,6	1.028	100
2011	GORDAL	435	174	40,0	158	36,3	158	100

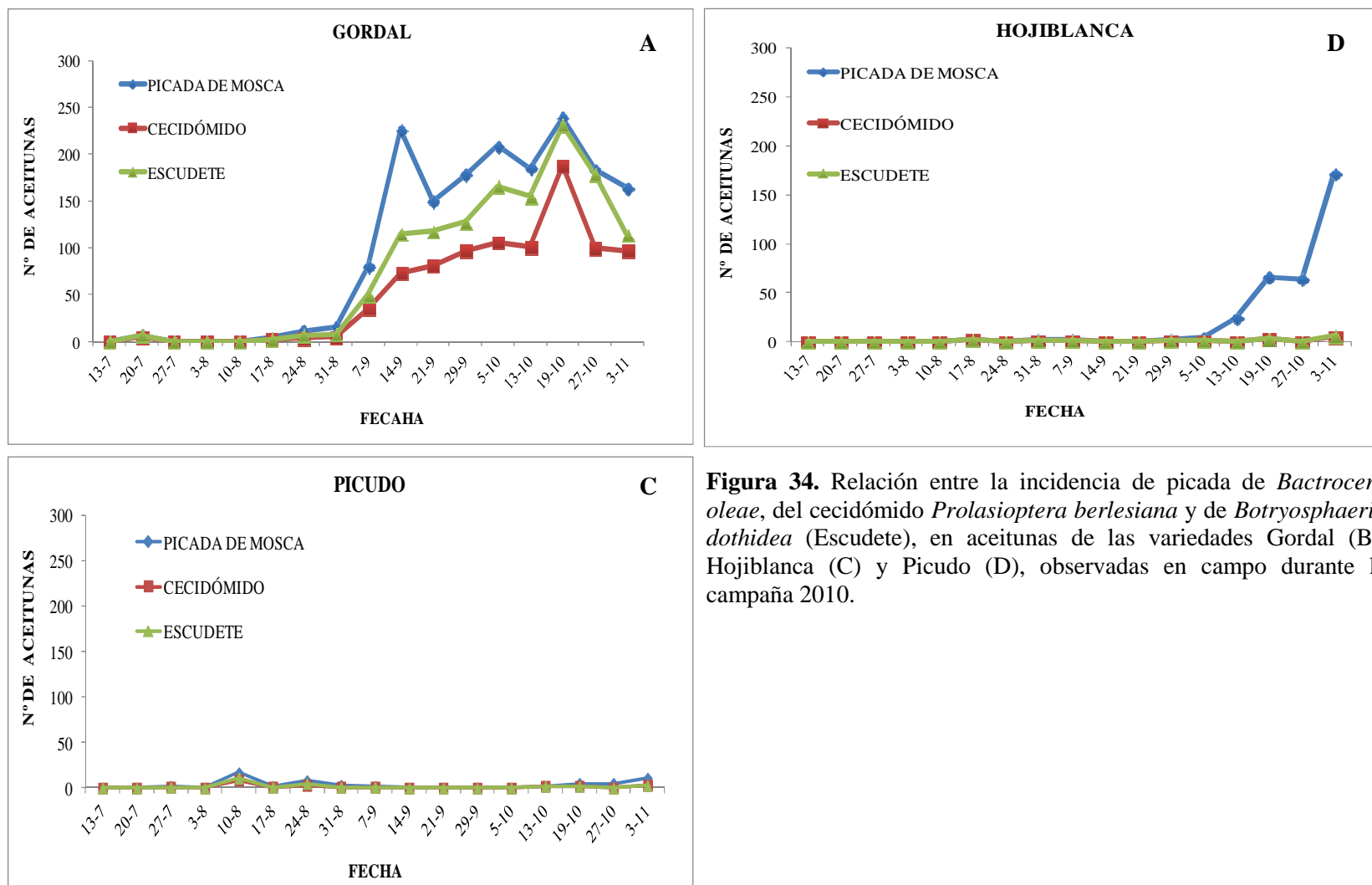


Figura 34. Relación entre la incidencia de picada de *Bactrocera oleae*, del cecidómido *Prolasioptera berlesiana* y de *Botryosphaeria dothidea* (Escudete), en aceitunas de las variedades Gordal (B), Hojiblanca (C) y Picudo (D), observadas en campo durante la campaña 2010.

4.2. Interacción entre *Prolasioptera berlesiana* y *Botryosphaeria dothidea* en picada de mosca viva y no viva.

Como ya se ha mencionado anteriormente (ver Resultados apartado 2.2.) la incidencia del cecidómido en picadas de mosca del olivo no vivas fue más alta que en picadas vivas. La Tabla 28 muestra que el desarrollo del Escudete estuvo relacionado con la presencia del cecidómido, encontrándose el insecto con mayor frecuencia en las picadas no vivas donde es más abundante la presencia del mismo. En todos los casos, la incidencia del Escudete es mayor que la del cecidómido (Tabla 28).

Tabla 28. Incidencia del cecidómido y Escudete en función del tipo de picada de mosca viva y no viva, en muestreos de aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en el laboratorio recogidas durante las campañas 2009, 2010 y 2011.

<i>Campaña</i>	<i>Variedad</i>	<i>Estado de Picada de mosca</i>		<i>Picada viva</i>				<i>Picada no viva</i>			
		<i>Viva</i>	<i>No viva</i>	<i>Con</i>		<i>Con</i>		<i>Con</i>		<i>Con</i>	
				<i>Escudete</i>		<i>cecidómido</i>		<i>Escudete</i>		<i>cecidómido</i>	
		<i>Nº</i>	<i>Nº</i>	<i>Nº</i>	<i>%</i>	<i>Nº</i>	<i>%</i>	<i>Nº</i>	<i>%</i>	<i>Nº</i>	<i>%</i>
2009	GORDAL	584	329	77	13,1	8	1,3	299	90,8	199	60,4
	HOJIBLANCA	943	312	55	5,8	11	1,1	280	89,7	87	27,8
	PICUDO	145	43	17	11,7	0	0,0	25	58,1	13	30,2
Total		1.672	684	149	8,9	19	1,1	604	88,3	299	43,7
2010	GORDAL	144	271	22	15,2	6	4,1	146	53,8	69	25,4
	HOJIBLANCA	53	37	5	9,4	0	0,0	18	48,6	17	45,9
	PICUDO	29	9	1	3,4	0	0,0	7	77,7	5	55,5
Total		226	317	28	12,3	6	2,6	171	53,9	91	28,7
2011	GORDAL	277	158	21	7,5	6	2,1	153	96,8	152	96,2

4.3. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* y *Botryosphaeria dothidea* (Escudete) en picadas artificiales simulando la picada de mosca (PSM).

Los resultados de los experimentos de campo, realizados a finales de Julio y final de Agosto del 2010 con picadas artificiales (PSM), muestran una semejanza entre picadas naturales y artificiales respecto a la incidencia del Escudete. Este resultado sólo se advierte en la variedad Gordal, ya que en las otras dos prácticamente no hubo picadas naturales (Tabla 29). Como se observa en esta tabla, el porcentaje de Escudete en las picadas es tres veces mayor cuando el cecidómido está presente.

Tabla 29. Incidencia del Escudete en función de la presencia de *Prolasioptera berlesiana* en picadas artificiales (simulando la picada de mosca PSM) en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en campo durante la campaña 2010.

Variedad	Ensayo**	Total picadas artificiales (PSM)	Escudete en picadas artificiales (PSM)					
					Con		Sin	
					cecidómido		cecidómido	
			Total	%	Nº	%	Nº	%
GORDAL	A	489	164	33,5	122	74,3	42	25,6
	B	554	330	59,5	277	83,9	53	16,0
Media		521,5	247	47,3	199,5	80,7	47,5	19,2
HOJIBLANCA	A	586	15	2,5	12	80,0	3	20,0
	B	609	199	32,6	169	84,9	30	15,0
Media		597,5	107	17,9	90,5	82,4	16,5	17,5
PICUDO	A	544	5	0,9	4	80,0	1	20,0
	B	600	40	6,6	31	77,5	9	22,5
Media		572	22,5	3,9	17,5	78,7	5	21,2

**Fechas de los experimentos: 27 de Julio (A) y 31 de Agosto (B).

En la Tabla 30 se muestra la incidencia del Escudete y el cecidómido en picadas artificiales y en la picada natural de mosca. La variedad Gordal registró el mayor número de picadas naturales de mosca, lo cual nos sirve como punto de referencia para su comparación con las picadas artificiales. Los dos agentes, el cecidómido y el Escudete, tuvieron más incidencia en las picadas naturales de mosca que en las artificiales. En la variedad Hojiblanca tuvieron poca incidencia, mientras que en Picudo el alto porcentaje de incidencia se debió a la baja tasa de picadas de mosca (Tabla 30).

Tabla 30. Comparación entre la incidencia del Escudete y el cecidómido en picadas naturales de *Bactrocera oleae* y artificiales (PSM), en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo observadas en campo durante la campaña 2010.

	Variedad	Total Picada	Con Escudete		Con cecidómido	
			Nº	%	Nº	%
Picada natural de <i>B. oleae</i>	GORDAL	1.652	1.279	77,4	894	54,1
	HOJIBLANCA	338	15	4,4	14	4,1
	PICUDO	57	27	47,3	23	40,3
Picadas artificiales (PSM)	GORDAL	521	247	47,4	199	80,7
	HOJIBLANCA	597	107	17,9	90	82,4
	PICUDO	572	22	3,8	17	78,7

4.4. Evaluación el efecto de dos tipos de picada artificial sobre la presencia de *Prolasioptera berlesiana* y el desarrollo de *Botryosphaeria dothidea* (Escudete).

En este estudio se comparó la influencia de la PSM con una picada artificial irregular (PIR) en la incidencia de *P. berlesiana* y el desarrollo de *B. dothidea*. El trabajo se realizó en la variedad Gordal. A las 48 horas después de efectuar las picadas el 40% de las aceitunas con la PSM tenían el cecidómido, mientras que en las de PIR no apareció en ninguna. En las aceitunas testigo aparecieron pocas picadas naturales de mosca y en más de la mitad de ellas estaba presente el cecidómido (Tabla 31). Posteriormente, las aceitunas picadas se introdujeron en una cámara húmeda, para favorecer el desarrollo del hongo *B. dothidea*, siendo observadas tres semanas después. El hongo se desarrolló en todas las picadas con

presencia del cecidómido y, como es lógico, no pudo desarrollarse en las PIR ya que en éstas no hubo presencia del mismo (Tabla 31).

Tabla 31. Incidencia del cecidómido y *Botryosphaeria dothidea* (Escudete) en dos tipos de picada artificial en aceitunas de la variedad Gordal a las 48 horas después de realizar las picadas artificiales.

**Tipo de picada	Total Picada	Nº de aceitunas			
		Con cecidómido		Con Escudete	
		Nº	%	Nº	%
PSM	400	161	40,2	178	44,5
PIR	160	0	0,0	0	0,0

** (PSM) picada artificial simulando la de mosca, (PIR) picada artificial irregular.

Cuando las aceitunas con PIR fueron observadas en campo a lo largo de varias semanas se registró una pequeña presencia del cecidómido especialmente en el exterior de las heridas. Asimismo se observó el desarrollo del Escudete, que tuvo una incidencia casi 2,5 veces mayor que la del cecidómido en estas heridas (14,5 y 6,4%, respectivamente). El primer registro fue a los 14 días después de efectuar la herida (Tabla 32).

Por otro lado, la incidencia de estos agentes fue bastante superior en el testigo (picadas naturales de mosca).

Tabla 32. Interacción cecidómido y *Botryosphaeria dothidea* (Escudete) en función del tiempo transcurrido desde la picada de mosca y picadas irregulares (PIR).

<i>Periodo de observación por Día</i>	<i>Picada artificial (PIR)</i>					
	<i>Total</i>			<i>Total</i>		
	<i>Con cecidomido</i>			<i>Con Escudete</i>		
		<i>Nº</i>	<i>%</i>		<i>Nº</i>	<i>%</i>
7	882	0	0,0	882	0	0,0
14		22	2,4		60	6,8
21		27	3,1		53	6,1
28		8	0,9		15	1,8
Total	882	57	6,4	882	128	14,5

4.5. Comprobación del desarrollo del Escudete en picadas artificiales recién efectuadas.

Para este estudio se realizaron los dos tipos de picadas artificiales en aceitunas de la variedad Gordal a mediados de Octubre del 2011 descritos en el apartado 6.2. de Materiales y Métodos. Las aceitunas picadas se recogieron 48 horas después de efectuar las heridas y se clasificaron atendiendo al tipo de picada de donde procedían, además se separaron según la presencia o ausencia del cecidómido, obteniendo así los cuatro grupos que están reflejados en la Tabla 33. Una vez en el laboratorio, se realizaron los aislamientos tomando pequeños trozos del interior de las picadas que fueron sembrados en medio de PDA. El hongo *B. dothidea* se desarrolló en todas las placas con aislamiento de aceitunas que tenían el cecidómido y en el 15% de placas con aislados de aceitunas sin presencia de éste, y en ambos casos proceden de aceitunas con las PSM. En los aislamientos de las aceitunas testigo (aceitunas sin lesiones) y de las PIR no se detectó crecimiento del hongo (Tabla 33).

Previamente a este experimento se realizaron aislamientos de un número reducido de aceitunas (5 de cada grupo) que fueron recogidas a las 24 horas después de efectuar las heridas. El hongo *B. dothidea* se detectó solamente en tres de los aislamientos de aceitunas con cecidómido procedentes de PSM.

Tabla 33. Frecuencia de aislamiento de *Botryosphaeria dothidea* de aceitunas de la variedad Gordal con dos tipos de picadas artificiales y recogidas a 48 horas en función de la presencia de *Prolasioptera berlesiana*.

<i>Tratamiento</i>	<i>Con cecidómido</i>	<i>Total</i>	<i>Con Escudete</i>	
			<i>Nº</i>	<i>%</i>
Testigo (aceitunas sanas)	No	60	0	0,0
PSM	Si	60	60	100
	No	60	9	15,0
PIR	No	60	0	0,0

4.6. Detección del patógeno *Botryosphaeria dothidea* en *Prolasioptera berlesiana*.

La detección de *B. dothidea* se llevó a cabo para los estados inmaduros (huevo, larva y pupa) y adultos (hembras) del cecidómido *P. berlesiana*. Se realizaron aislamientos en medio de cultivo PDA ácido, tanto de la superficie externa como del interior del cuerpo de los ejemplares. Los resultados negativos de los aislamientos señalan la ausencia del hongo en la superficie y en el interior del cuerpo de los estados inmaduros del cecidómido. Sin embargo, los aislamientos realizados a partir de los adultos (hembras), confirmaron la presencia del hongo *B. dothidea* en la superficie interna, mientras que en la superficie externa no fue detectado.

Por otro lado, en observaciones microscópicas realizadas en el abdomen de las hembras de *P. berlesiana*, se pudo detectar la presencia de una bolsa (mycangia) asociada a los segmentos terminales del abdomen en la cual se observaron conidios de *B. dothidea*. (Figura 35).

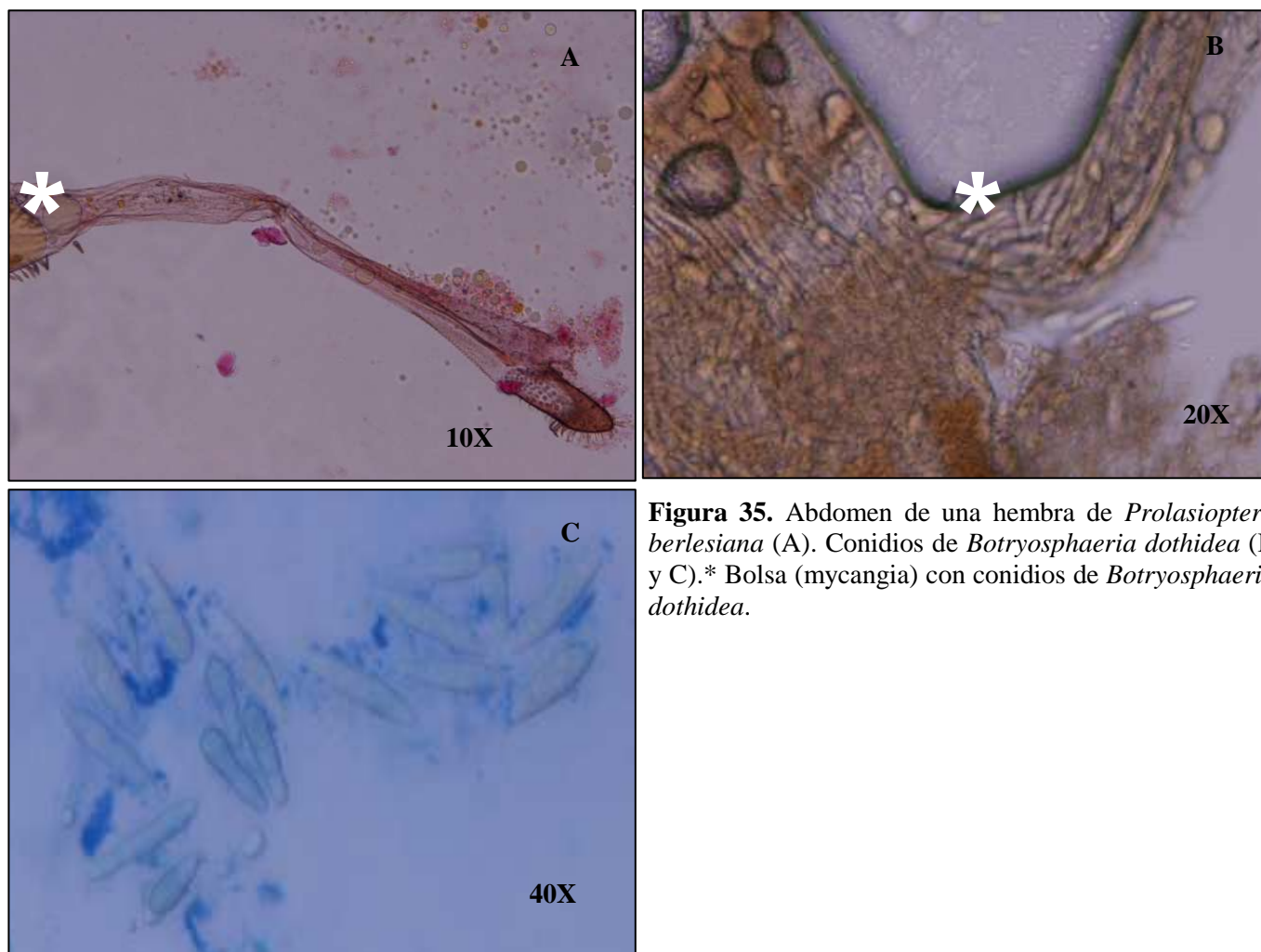


Figura 35. Abdomen de una hembra de *Prolasioptera berlesiana* (A). Conidios de *Botryosphaeria dothidea* (B y C). * Bolsa (mycangia) con conidios de *Botryosphaeria dothidea*.

4.7. Comportamiento alimenticio de las larvas del cecidómido.

El comportamiento alimenticio de *P. berlesiana* fue evaluado de dos formas:

1. Cría sobre cultivo de *Botryosphaeria dothidea*.

Huevos o larvas recién nacidas del cecidómido fueron colocadas sobre un cultivo puro del hongo *B. dothidea* y luego incubados en condiciones de insectario. El 70% (21/30) de los individuos pudieron completar su desarrollo hasta el estado adulto utilizando el micelio del hongo como fuente de alimento.

2. Cría sobre aceitunas.

Larvas del cecidómido recién nacidas fueron transferidas a aceitunas previamente desinfectadas y artificialmente picadas simulando la picada de la mosca *B. oleae*. Los resultados de este ensayo muestran que las larvas no pudieron desarrollarse y todas murieron a dos o tres días después de su transferencia.

DISCUSIÓN

1. Incidencia de los agentes (Mosca, Mosquito y Escudete).

1. 1. Mosca de olivo (*Bactrocera oleae*).

El uso de trampas cebadas con atrayentes alimenticios, en combinación con las trampas cromotrópico-sexuales, es la técnica más apropiada para detectar la presencia y estimar la abundancia de adultos de *B. oleae* (Civantos, 1999). En nuestro trabajo, los niveles de capturas en trampas alimenticias durante la campaña 2010 concuerdan con los obtenidos en esta misma finca en estudios realizados durante las campañas 2003 y 2004 (Sabariego-Sánchez, 2007), 2001 y 2002 (Aldebis *et al.*, 2002; Aldebis y Vargas-Osuna, 2003). La mayor captura de adultos de mosca del olivo se obtuvo en la segunda mitad de la campaña, especialmente entre finales de Septiembre y principios de Noviembre, probablemente debido al comienzo de la segunda generación de *B. oleae* y a las suaves temperaturas de la zona. En general, las curvas de capturas de *B. oleae* se encuadraron dentro de la dinámica poblacional que presenta la especie, la cual se caracteriza por estar relacionada con diversos factores ambientales, de tal forma que tanto el número de generaciones anuales como los niveles poblacionales varían en función de la zona y año de estudio (De Andrés-Cantero, 2001).

La evolución del daño en aceitunas es paralela a la evolución poblacional de la mosca. La variedad Gordal reúne gran parte de las características (mayor tamaño de sus frutos, aceituna de mesa, etc.) para la preferencia de la mosca, por lo que está considerado entre las variedades más susceptibles a sus ataques (Pucci y Ambrosi, 1981; Dominici *et al.*, 1986; Iannotta *et al.*, 2006; Rizzo y Caleca, 2006). El mayor número de aceitunas picadas por *B. oleae* durante la campaña 2010 ocurrió en la variedad Gordal (media 10,4%), alcanzando el máximo de 25,1% a mediados del mes de Octubre. Esta incidencia, relativamente alta, contrasta con los niveles de captura de la mosca, relativamente bajos, con un máximo de algo menos 4 adultos/trampa/día alcanzado a principios de Octubre en la misma variedad. Esto posiblemente fue debido a que únicamente se usaron trampas alimenticias que no fueron capaces de reflejar los niveles poblacionales reales de la mosca, ya que la técnica más completa es el uso combinado de éstas con las trampas cromotrópico-sexuales. En las muestras observadas en laboratorio durante 2010 y 2011, el alto porcentaje de aceitunas

picadas se debió a que era el resultado de sólo dos muestreos y, además, recogidos en el mes de Octubre, el mes de máxima actividad de la mosca en esta zona como se ha señalado anteriormente.

La primera picada con huevos (picada viva) fue observada a finales de Julio; mientras que en trabajos anteriores en el olivar de Cabra esto se produjo en la segunda semana de Agosto y principios de Septiembre para las campañas 2001, 2002, 2003 y 2004 (Aldebis *et al.*, 2002; Aldebis y Vargas-Osuna, 2003; Sabariego-Sánchez, 2007). No obstante, en el estudio realizado por estos autores no se incluía la variedad Gordal, en la cual ha sido registrada la primera picada viva y el mayor número de aceitunas picadas de *B. oleae* en el presente trabajo.

1. 2. El mosquito de la aceituna (*Prolasioptera berlesiana*)

La incidencia de poblaciones del cecidómido *P. berlesiana* en el olivar está principalmente relacionada con los niveles poblacionales de *B. oleae*, ya que está considerado por muchos como depredador/ectoparásito de huevos de la mosca del olivo (Fraval, 1977; Arambourg 1986; De Laurentiis, 1993; Hepdurgun y Onder, 1999; De Andrés-Cantero, 2001).

Los niveles de incidencia de *P. berlesiana* rondaron el 5,5% (N=894/1.5759 aceitunas) de todas las aceitunas observadas en la variedad Gordal durante la campaña 2010. Esta variedad, como se ha dicho antes, está considerada entre las variedades más susceptibles al ataque de la mosca (Alvarado *et al.*, 2010). De Laurentiis (1993) señala que la incidencia del cecidómido en variedades susceptibles a los ataques de la mosca olivo era más alta que en variedades menos susceptibles o tolerantes.

Prolasioptera berlesiana estuvo presente durante todo el periodo de muestreo, entre el 20 Julio y el 3 de Noviembre en la campaña 2010. Esta presencia se determinó a partir de la recogida de estados inmaduros directamente de aceitunas, por lo que desconocemos la fecha de salida de los adultos, lo cual se podría haber determinado con el uso de trampas cromotrópicas. González (2006), en un olivar de la provincia de Sevilla, observó la presencia

del cecidómido también a partir de estados inmaduros, desde la segunda semana de Agosto hasta la tercera semana de Noviembre.

El mosquito siempre fue detectado en las picadas de *B. oleae*. En la mayoría de los orificios de puesta se detectó un huevo o larva del cecidómido, aunque en ocasiones se observaron dos, coincidiendo así con De Laurentiis (1993), que observó la presencia de 2 - 3 huevos del mosquito en una misma herida de la mosca. Las pupas siempre se encontraron en el exterior del orificio de la picada de *B. oleae* o muy cerca de él.

Se desconoce el número de generaciones por año de *P. berlesiana*. No obstante, en Turquía Hepdurgun y Onder (1999) observaron 3 y 4 generaciones en los años 1996 y 1997, respectivamente. Otros autores han señalado que en diferentes condiciones de campo la duración de una generación supera los 19 días en el verano y los 28 días en el otoño (Neuenschwander *et al.*, 1983; De Laurentiis, 1993; Hepdurgun y Onder, 1999). Según nuestros resultados, en condiciones controladas de insectario ($26^{\circ}\pm 2$, $65\text{HR}\pm 5$ y 14 horas luz), el tiempo de desarrollo desde el huevo hasta la emergencia del adulto fue 15,5 días, con un periodo de incubación de 1,7 días y un tiempo de desarrollo larvario de 7,5 días; mientras que en campo, según indica Arambourg (1986) y Hepdurgun y Onder (1999), el desarrollo larvario es de 9 días en verano y 13 en invierno.

El cecidómido encontrado en las aceitunas se identificó como *Prolasioptera berlesiana*, en base a los caracteres morfológicos descritos en la bibliografía de Paoli (1907), Coutin y Katlabi (1986), Hepdurgun y Onder (2000) y Doganlar *et al.* (2011).

1.3. El Escudete causado por *Botryosphaeria dothidea*

La enfermedad del Escudete presenta generalmente una baja incidencia aunque, en determinadas condiciones de espacio y tiempo puede alcanzar niveles considerables, tal como ocurrió en Brindisi (Italia) en 2002, donde la temperatura y humedad fueron mucho más elevadas que en años anteriores (Longo *et al.*, 2004).

En nuestro estudio, la incidencia de Escudete en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo fue muy baja durante los meses del verano (Julio y Agosto), mientras

que en los meses del otoño fue más alta. Los primeros casos de infección se observaron a finales de Julio en aceitunas de las variedades Gordal y Picudo y, a mediados de Agosto, en Hojiblanca. En dos parcelas de olivar de la variedad Gordal en la sierra sur de Sevilla, los primeros síntomas de Escudete se registraron a mediados de Agosto y a finales del mismo mes (González, 2006).

2. Interacción *Bactrocera oleae* - *Prolasioptera berlesiana*.

2. 1. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picada natural de *Bactrocera oleae*.

El análisis de las aceitunas recogidas durante los años del estudio muestra que la mayor incidencia del cecidómido coincidió con los periodos de mayor presencia de mosca. Los resultados fueron más evidentes en la variedad Gordal donde hubo mayor incidencia de ambas poblaciones. Nuestras observaciones durante la campaña 2010, muestran que la evolución poblacional de *P. berlesiana* es posterior a la de *B.oleae*. Los picos de incidencia del mosquito se producen durante la semana siguiente a la de mayor incidencia de la mosca. Sin embargo, esta máxima incidencia del cecidómido está directamente relacionada con el máximo de incidencia de picadas de *B.oleae*, ya que el mosquito siempre fue detectado en el interior de las picadas de *B. oleae*. Resultados semejantes fueron obtenidos en olivares de distintas localidades de Grecia por Neuenschwander *et al.* (1983). Estos autores indicaron dos picos en las poblaciones de *P. berlesiana*, uno a finales de Agosto y el otro en la segunda mitad de Octubre. Además, el cecidómido fue también detectado en las aceitunas una semana después de la aparición de las picadas vivas de *B .oleae*, y su mayor incidencia fue registrada con la alta presencia de las mismas.

Harpaz y Gerson (1966), en sus investigaciones sobre interacción entre *P. berlesiana*, *B. oleae* y *B. dothidea*, concluyeron que *P. berlesiana* se alimenta con el hongo y por lo tanto no lo consideran un depredador de huevos de *B. oleae*. Estas observaciones contradicen las de anteriores estudios que sugerían una estrecha relación entre estos tres organismos y en las se que atribuía al cecidómido un papel esencial como depredador de huevos de la mosca del olivo (Silvestri, 1945; Ayoutantis *et al.*, 1954; Melis ,1962; Narayanan y Chawla, 1962). Poco más tarde, Solinas (1967) reconoce que *P. berlesiana* requiere al hongo para su alimentación, pero también depreda huevos y larvas jóvenes de la mosca e incluso las de su misma especie.

En nuestro estudio, *P. berlesiana* estuvo presente en el 54% de aceitunas Gordal picadas por *B. oleae* durante la campaña del 2010. Incluso en el momento de máxima incidencia de la mosca, en la segunda mitad de Octubre, este porcentaje superó el 78% de las aceitunas picadas. Estos resultados sugieren una estrecha relación entre *B. oleae* y *P. berlesiana*, coincidiendo con Neuenschwander *et al.* (1983) que señalaron una relación directa positiva entre la incidencia de *P. berlesiana* en aceitunas y la presencia de picadas de *B. oleae*. Sin embargo, Harpaz y Gerson (1966) encontraron al mosquito sólo en el 2% de aceitunas picadas por la mosca, y González *et al.* (2006) señalaron que su presencia superaba el 15% de las aceitunas picadas.

Por otro lado, el mayor porcentaje de aceitunas con presencia de *P. berlesiana* se corresponde con picada no viva, que en el caso de la variedad Gordal en 2011 superó el 96%. En las picadas no vivas se observaron sólo larvas de *P. berlesiana*, sin que se encontrará resto alguno de huevo de mosca ni la presencia de túneles abiertos por sus larvas. En este caso cabría pensar en el papel que juega el mosquito como depredador de huevos o larvas jóvenes de *B. oleae*, enmascarando así el porcentaje de aceitunas con picadas vivas, lo que explicaría esta amplia diferencia entre aceitunas con picada viva y no viva y con presencia del cecidómido. Otros autores indican también esta tendencia donde siempre la presencia de *P. berlesiana* en picadas de mosca no vivas es mayor que en las vivas y lo atribuyen al comportamiento depredador del mosquito (Neuenschwander *et al.*, 1983; De Laurentiis, 1993; González *et al.*, 2006).

2.2. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picadas artificiales simulando la picada de mosca (PSM).

Aunque la alta presencia de *P. berlesiana* en aceitunas con picadas no vivas de *B. oleae* se puede atribuir al comportamiento depredador del cecidómido, cabe la duda de si muchas de estas picadas son realmente no vivas como resultado de pruebas de oviposición de la mosca. En dos experimentos de campo en los que se realizaron picadas artificiales que simulaban la picada de la mosca (PSM) a finales de Julio y a finales de Agosto, *P. berlesiana* se halló en un porcentaje muy elevado en las aceitunas, siendo su presencia mayor en la variedad Gordal, tal como vienen mostrando los resultados de todos los muestreos con picadas naturales de *B. oleae*. Por otro lado, las aceitunas picadas a finales de Agosto tuvieron

mucha más presencia del mosquito que las picadas efectuadas a finales de Julio en las tres variedades, probablemente debido a la mayor población de mosquito como consecuencia de una mayor incidencia poblacional y de picada de mosca.

Por otro lado, no sólo hemos comprobado la presencia de *P. berlesiana* en picadas artificiales simulando la picada de *B. oleae*, sino también se ha constatado que en estas picadas se desarrolla el hongo *B. dothidea* causante del Escudete, sobre el cual el cecidómido completa su desarrollo. Esto confirma las afirmaciones o sugerencias manifestadas por algunos autores de que *P. berlesiana* no requiere la presencia de huevos o larvas de *B. oleae*, que su principal alimentación es el hongo y, que en caso de que encuentre el huevo de mosca en el orificio de puesta, lo depreda (Harpaz y Gerson, 1966; Solinas, 1967; Sasso y Viggiani, 2007; Viggiani y Sasso, 2008). Algunos de estos autores señalan también que las larvas de *P. berlesiana* tienen un comportamiento oportunista, micofágo o saprófito, y se alimentan sobre los hongos que aprovechan heridas de distinta naturaleza en las aceitunas. Principalmente estas heridas son provocadas por la mosca y el hongo es *B. dothidea* (Sasso y Viggiani, 2007; Viggiani y Sasso, 2008).

Para determinar el grado de relación entre *P. berlesiana* y *B. oleae*, en otro experimento se realizaron dos tipos de heridas, una simulando la picada natural de la mosca (PSM) y otra, a la que llamamos Picada Irregular (PIR), sin una forma particular. El resultado de este estudio indica que no se detectó presencia del cecidómido en las PIR hasta 14 días después de realizar la picada, con un porcentaje por debajo del 6,5%. Sin embargo, en los frutos con PSM la presencia del cecidómido superó el 40% a las 48 horas después de realizar la picada. Por lo tanto, aunque el mosquito no requiere la puesta viva de la mosca, sí prefiere para realizar su puesta el tipo de picada de la mosca a otro tipo de heridas. No obstante, según Sasso y Viggiani (2007), *P. berlesiana* durante verano y otoño puede ovipositar en cualquier herida que se encuentre en la aceituna.

Por otro lado, en las aceitunas con PSM recogidas a las 24 horas después de realizar la herida, *P. berlesiana* había puesto en casi el 24% de los casos, valor que aumentó hasta el 48% en aceitunas recogidas a las 48 horas. Es decir, tuvo la misma cantidad de puesta tanto en el primer como en el segundo día. Esto confirma que el mosquito aprovecha las picadas recientes (al menos hasta 48 horas) de la mosca para realizar su puesta (Arambourg, 1986; De

Andrés-Cantero, 2001). En cualquier caso se requeriría ampliar el estudio varios días más para determinar hasta cuanto tiempo las picadas están receptivas para la puesta de *P. berlesiana*.

3. Interacción *Bactrocera oleae* y *Botryosphaeria dothidea*.

La dispersión del hongo *B. dothidea* por la mosca del olivo *B. oleae* de forma directa es desconocida, aunque algunas citas mencionan a *B. oleae* como un factor de dispersión del patógeno *B. dothidea* (Neuenschwander *et al.*, 1983; Iannotta *et al.*, 2007 y 2008).

Los resultados de nuestro estudio durante la campaña 2010 muestran que muchas de las aceitunas con picada de mosca mostraban síntomas de Escudete en ausencia de *P. berlesiana*. Este resultado fue más evidente en la variedad Gordal, en la que la mitad de las aceitunas sin presencia del cecidómido mostraban síntomas de Escudete. Sin embargo en las otras dos variedades (Hojiblanca y Picudo) el número de picadas de mosca en general fue muy bajo, por lo que no se consideró representativo. Sin embargo, este alto porcentaje de aceitunas con síntomas de *B. dothidea* no se puede atribuir únicamente a la dispersión del hongo por *B. oleae*, ya que existe una probabilidad muy alta de que el cecidómido pudiera estar en el interior de las picadas y luego abandonarlas sin dejar rastro. Por lo tanto una gran parte de este porcentaje puede ser atribuido al mosquito.

Por otro lado, grupos de aceitunas con picada de mosca sin presencia del mosquito y de aceitunas que no mostraban síntomas de picada o enfermedad fueron observadas en laboratorio e introducidas después en cámara húmeda. El resultado de las observaciones en la variedad Gordal indicó que el 27,3% de las aceitunas del primer grupo mostraban síntomas de Escudete, mientras que estos síntomas aparecieron en sólo el 4,3% de las aceitunas que no tenían síntomas de picada o enfermedad. La aparición del Escudete en aceitunas no picadas de mosca no concuerda con la postura de Harpaz y Gerson (1966) y Arambourg (1986) sobre la imposibilidad de que *B. dothidea* se desarrolle en aceitunas que no estén picadas por la mosca. Sin embargo, este porcentaje es muy reducido y además está inducido en cámara húmeda, por lo que podría no darse en condiciones de campo. Por lo tanto no se puede considerar éste un resultado concluyente.

Los aislamientos en medio de cultivo PDA ácido, realizados para comprobar la presencia del hongo *B. dothidea* en adultos y estados inmaduros del *B. oleae*, mostraron que éste fue detectado sólo en la superficie externa en el 74% de las hembras adultas, independientemente de la variedad de la que fueron capturadas. La identidad del hongo aislado fue confirmada mediante técnicas moleculares de PCR. A pesar de este resultado, existe la duda de si el hongo llevado en la superficie externa del cuerpo de la hembra es capaz de provocar una infección que resulte en el desarrollo de la enfermedad y, mucho menos, en grandes dimensiones. De hecho, en la prueba realizada en laboratorio en la que fue inoculada una elevada concentración de conidios de *B. dothidea* en picadas artificiales (PSM) que simulaban la picada de la mosca, no se desarrolló la enfermedad.

4. Interacción *Bactrocera oleae* - *Prolasioptera berlesiana* - *Botryosphaeria dothidea*.

Esta discusión está basada principalmente en los resultados obtenidos usando la variedad Gordal, ya que los obtenidos en las variedades Hojiblanca y Picudo, aunque siempre ofrecen la misma tendencia y apoyan los resultados en la variedad Gordal, no son representativos debido a la poca incidencia de las poblaciones de los tres agentes en los años de estudio.

4.1. Incidencia del *Prolasioptera berlesiana* y *Botryosphaeria dothidea* en aceitunas con picada natural de mosca (*Bactrocera oleae*).

En la bibliografía existe amplia divergencia de opiniones sobre la interacción de los tres agentes implicados en este estudio. Algunos señalan a *P. berlesiana* como posible vector de *B. dothidea*, pero la forma en la que participa en la dispersión del patógeno, así como la importancia que se le dé como vector o como depredador de huevos de *B. oleae*, son diferentes según sea el autor (Harpaz y Gerson, 1966; Solinas, 1967; Neuenschwander *et al.*, 1983; Arambourg, 1986; De Laurentiis, 1993; La Greca y Vrenna, 1995; De Andrés-Cantero, 2001; Sasso y Viggiani, 2007; Viggiani y Sasso, 2008).

Los resultados de este estudio indican que la incidencia de *B. dothidea* en aceitunas picadas por *B. oleae* fue siempre superior a la incidencia de *P. berlesiana* en las mismas, encontrándose el mosquito sólo en aceitunas picadas y con Escudete. Por ejemplo, durante la

campana de 2010 en la variedad Gordal la incidencia del Escudete en las picadas superó el 77%, mientras que la incidencia del mosquito en las mismas fue de alrededor del 54% y en todas estas picadas que tenían el mosquito se desarrolló el Escudete. El hecho de que todas las aceitunas picadas y con presencia del cecidómido desarrollaron la enfermedad sugiere una estrecha relación entre *P. berlesiana* y *B. dothidea*. La mayor incidencia del hongo en las aceitunas picadas podría en gran parte ser atribuida también al mosquito, teniendo en cuenta que es muy probable que el cecidómido estuviera en el interior de los orificios de puesta y luego los abandonara sin dejar rastro detectable.

Del mismo modo, cuando analizamos los resultados ateniéndonos al tipo de aceitunas, con picada viva y no viva, observamos la misma tendencia en la incidencia de los dos agentes *B. dothidea* y *P. berlesiana*, pues ambos se encuentran con mayor frecuencia en la aceitunas con picada no viva que con picada vivas. En todos los casos, la incidencia del Escudete también es mayor que la del cecidómido.

Estos resultados, junto a los resultados de evolución poblacional y la correlación observada entre los máximos de incidencia de los tres agentes anteriormente discutidos, sugieren una relación entre estos organismos y ofrece un grado de solidez a la postura de otros autores (Solinas, 1967; Neuenschwander *et al.*, 1983; Arambourg, 1986; De Laurentiis, 1993; La Greca y Vrenna, 1995; De Andrés-Cantero, 2001).

4.2. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* y *Botryosphaeria dothidea* en picadas artificiales simulando la picada de mosca (PSM).

Los resultados de los experimentos de aceitunas con picadas artificiales (PSM) muestran que el porcentaje de la incidencia del Escudete es casi de tres a cinco veces mayor cuando el cecidómido está presente en las aceitunas (74,4 y 83,9% en los Experimentos A y B, respectivamente) que cuando las aceitunas no tienen el cecidómido (25,6 y 16,1% en los Experimentos A y B, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias pueden en realidad ser aún mayores, teniendo en cuenta un porcentaje de casos en los que el mosquito no pudo ser detectado al haber salido del orificio de puesta de la mosca.

En cuanto a la incidencia de *B. dothidea* y *P. berlesiana* en aceitunas con dos tipos de picadas artificiales, picada PSM y picada irregular PIR, se observa que a las 48 horas después de realizar la herida, el cecidómido aparece en el 40,3% de las aceitunas con PSM, mientras que en las que tienen PIR no se observó en ninguna aceituna. El Escudete se desarrolló en el 44,5% sólo de las aceitunas con PSM después de introducir todas las aceitunas en cámara húmeda. Sin embargo, cuando las picadas PIR se observaron durante 4 semanas en condiciones de campo, el cecidómido apareció a los 14 días (posiblemente antes porque el muestreo fue semanal) después de realizar la picada, encontrándose en el 6,5% de las aceitunas con PIR y el Escudete se desarrolló en 14,5% de las aceitunas con este tipo de picada artificial. Cabe mencionar que en las picadas PIR siempre se encontraron varias larvas (más de dos larvas) y fuera de la herida. En estos casos tenemos la sospecha de que pudiera tratarse de otra especie, lo que habría que confirmar en próximos estudios.

Por otro lado, los aislamientos en cultivo PDA realizados a partir de aceitunas 48 horas después de efectuar las heridas de los dos tipos (PSM y PIR), indicaron que el hongo sólo estaba presente en las picadas PSM y en ninguna de las aceitunas PIR. Además, el hongo fue aislado de todas las PSM con presencia de *P. berlesiana* y en el 15% de las PSM sin presencia del cecidómido. Cabría la posibilidad de que este pequeño porcentaje de presencia del hongo se debiera a heridas que habían estado colonizadas también por *P. berlesiana*. Esta explicación se basa en: 1) El hongo sólo se encontró en todas las picadas PSM con presencia del mosquito y en ninguna de las PIR; 2) La incidencia del hongo en las picadas sin mosquito fue baja (15%) en comparación con el 100% en aceitunas cuando estaba presente el mosquito. Esto sugiere una estrecha relación entre *B. dothidea* y *P. berlesiana* y que la infección por el hongo en las aceitunas con heridas sólo podría haber ocurrido a cargo del cecidómido, actuando éste como dispersor o como vector del patógeno.

La estrecha relación entre *B. dothidea* y *P. berlesiana* pudo ser demostrada mediante el experimento de cría del cecidómido sobre un cultivo puro de *B. dothidea* en PDA, el cual indicó que el 70% de los huevos o larvas neonatas transferidos a este cultivo podían completar su desarrollo hasta el estado adulto. No obstante, los huevos y larvas que fueron transferidos a aceitunas picadas con PSM no pudieron causar infecciones en las aceitunas y tampoco pudieron sobrevivir más 48-72 horas. Sasso y Viggiani (2007) señalan que *P. berlesiana* es micófago o saprófito, oviposita probablemente atraído por hongos o tejido de la planta

huésped, sus larvas se alimentan de los hongos invasores (comúnmente *B. dothidea*), y quizás también del tejido vegetal en descomposición y, accidentalmente, de huevos o larvas de *B. oleae*. Sin embargo, nuestros resultados indican que el principal alimento de *P. berlesiana* es el hongo *B. dothidea* y que las larvas no necesitan alimentarse del tejido de la aceituna, si bien sería interesante comprobar si el cecidómido se alimenta también de otras especies de hongos distintas a *B. dothidea*.

Los adultos del mosquito emergidos de aceitunas con síntomas de Escudete y confinados con aceitunas sanas previamente picadas con PMS no tuvieron éxito en transmitir el hongo *B. dothidea* y causar infecciones en las aceitunas. Shun *et al.* (2012) no consiguieron aislar *B. dothidea* de las mycangias de adultos de *Illiciomyia yukawai* emergidos de agallas que eran confinadas en bolsas de plástico. Estos autores concluyeron que los adultos recién emergidos no incorporaban el hongo en la mycangia directamente de las agallas donde se habían desarrollado.

Los aislamientos de *B. dothidea* realizados directamente de la superficie externa y del interior de *P. berlesiana*, tanto de estados inmaduros (huevos, larvas y pupas) como de adultos (hembras), sólo detectaron el hongo en el interior de las hembras. Además, las observaciones microscópicas permitieron reconocer una cámara situada en los últimos segmentos abdominales, junto al oviscapto, en cuyo interior se pudo observar en algunos casos conidios del hongo. La bibliografía científica señala a muchas especies de cecidómidos que llevan esta estructura especializada (mycangia), en donde la hembra incorpora los conidios o el micelio del hongo mutualista (Rohfritsch, 2008; Heath y Stireman, 2010; Lebel *et al.*, 2012; Shun *et al.*, 2012). Concretamente, en la tribu Lasiopterini esta estructura se encuentra en el octavo o noveno segmento abdominal (Borkent y Bissett, 1985; Roskam, 2005). El hecho de que algunas especies de mosquitos lleven mycangias en su abdomen u oviscapto refuerza el concepto de mutualismo, en lugar de oportunismo, en la relación entre estos insectos con los hongos asociados (Borkent y Bissett, 1985; Rohfritsch, 2008; Adir *et al.*, 2009; Heath y Stireman, 2010). De acuerdo con este concepto, los resultados del presente estudio sugieren que la relación existente entre *B. dothidea* y *P. berlesiana* podría ser del tipo mutualista, actuando el mosquito como vector del patógeno. Por el contrario, Viggiani y Sasso (2008) insisten que *P. berlesiana* es oportunista y no tiene una asociación directa con *B. dothidea* ni tampoco su incidencia en olivar está relacionada con la población *B. oleae*.

Estos resultados apoyan la opinión de que existe una relación entre los tres agentes implicados en el desarrollo de la enfermedad del Escudete, el hongo *B. dothidea* causante de la enfermedad, *P. berlesiana* como principal factor de dispersión del patógeno y *B. oleae* como nexo entre ellos, coincidiendo con algunos y contradiciendo a otros autores en cuanto a la escala de asociación entre los agentes, la forma de dispersión del patógeno y el grado de implicación de cada agente en el desarrollo de la enfermedad del Escudete.

CAPÍTULO II.

**Influencia del barrenillo del olivo *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.)
(Coleoptera, Scolytidae) en la dispersión de Verticilosis causada por
Verticillium dahliae Kleb.**

INTRODUCCIÓN

La Verticilosis del olivo (VO), causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb, es una de las enfermedades más importantes que amenaza al olivar en los países cultivadores de la Cuenca Mediterránea (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Días *et al.*, 2012; Mercado Blanco y López-Escudero, 2012). En la actualidad es la enfermedad más preocupante del olivar español, especialmente en Andalucía, comunidad autónoma que agrupa la mayor superficie de olivar (62%, más de 1,5 millones de hectáreas) y que es líder mundial en la producción de aceite de oliva y aceituna de mesa. El patógeno afecta severamente a plantaciones adultas como a las de reciente establecimiento, pudiendo causar grandes pérdidas de producción y, en muchos casos, la muerte del árbol. Prospecciones de campo recientes sobre la marchitez causada por *V. dahliae* en olivares afectados en Andalucía revelaron una incidencia media de 12, 22 y 24%, en las tres principales provincias productoras de aceituna, Sevilla, Córdoba y Jaén, respectivamente (López-Escudero *et al.*, 2010).

En el suelo, los microesclerocios del patógeno germinan y producen infecciones en las raíces del olivo, iniciando la colonización de los tejidos que conducirá al patógeno a los vasos del xilema. Allí, el hongo produce micelio y nuevos conidios, colonizándolo longitudinalmente y transversalmente el xilema de la planta. Esta traqueomicosis interrumpe el transporte de agua y, posteriormente, produce la marchitez y la muerte del árbol (Schnathorst, 1981; Trapero-Casas y Blanco-López, 2010).

Algunas de las principales causas de la prevalencia de la VO son el uso de suelos infestados, debido al cultivo anterior de huéspedes susceptibles al patógeno, y la infestación de los suelos con inóculo proveniente de varias fuentes externas. Se han descrito una serie de medios de dispersión del patógeno en las zonas de cultivo del olivo, principalmente relacionados con el movimiento de las estructuras infecciosas y de supervivencia (microesclerocios) (Schnathorst y Sibbett, 1971; Thanassouloupoulos, 1993; Tjamos, 1993; Serrhini y Zerual, 1995; López-Escudero y Blanco López, 2005; Rodríguez-Jurado y Bejarano-Alcázar, 2007; López-Escudero *et al.*, 2008; Trapero *et al.*, 2011; López-Escudero *et al.*, 2012). Igualmente los insectos podrían actuar como posibles vectores del patógeno *V. dahliae*, aunque la información disponible a este respecto es muy escasa.

Se sabe que varias especies de hongos causantes de enfermedades en plantas leñosas pueden ser transmitidas eficientemente por insectos xilófagos (Webber y Gibbs, 1989), especialmente coleópteros de la familia Scolytidae. Una característica de los escolítidos es su amplia asociación con hongos, siendo algunas de las más notables las interacciones con especies del género *Ophiostoma* (Ascomycota), hongos responsables de la decoloración de la madera y causantes de graves enfermedades de árboles (Wingfield *et al.*, 1993, Kirisits, 2004). No obstante, sólo en unos pocos casos se ha mostrado que estos insectos estén asociados directamente con las enfermedades vasculares. El ejemplo más representativo de una enfermedad vascular causada por un hongo transmitido por escolítidos es la enfermedad del olmo holandés, causada por *Ophiostoma ulmi*, que se transmite por *Scolytus* spp. (Webber, 2004). Los adultos del insecto transportan los conidios del patógeno al quedar pegados a sus cuerpos cuando abandonan las galerías de apareamiento en los olmos enfermos, dirigiéndose a árboles sanos para hacer galerías de alimentación. En cualquier caso, este hecho está reconocido como una relación mutualista entre el escolítido y el hongo.

En el caso de *V. dahliae* existe muy poca información sobre su transmisión por insectos. En una antigua referencia, Popushoi y Kulik (1976) señalaron que *V. dahliae*, causante de la Verticilosis de albaricoque, podría transmitirse por el escarabajo de la corteza de fruta *Scolytus rugulosus*. Además, curiosamente, Tiberi y Ragazzi (1998) demostraron la transmisión de *V. dahliae* por los insectos vectores xilófagos *Scolytus intricatus* (Ratz.) y *Xyleborus dispar* (F.), cuando estudiaban las causas del decaimiento del roble en Italia. Sin embargo, el roble no es un huésped común de *V. dahliae*.

Otro caso de excepción es la alfalfa, en donde ciertos insectos como el pulgón del guisante, el gorgojo de la alfalfa, algunos saltamontes migratorios, o la abeja cortadora de hojas pueden actuar como vectores para la transmisión eficaz de *Verticillium alboatrum* (Huang, 2003).

El escolítido *Phloeotribus scarabaeoides* (Bernard), conocido como “barrenillo del olivo”, está considerado una de las plagas secundarias que atacan el olivar en la Zona Mediterránea (Alvarado *et al.*, 2010). Es un pequeño insecto xilófago con un ciclo biológico similar al de otros escolítidos xilófagos asociados a hongos fitopatogenos.

Aunque no se tienen evidencias de transmisión por insectos de la VO, la naturaleza vascular de las infecciones de *V. dahliae* en el olivo y el ciclo de vida de *P. scarabaeoides* podría propiciar una interacción entre los dos organismos con respecto a la propagación del patógeno (probablemente conidios) desde árboles afectados por VO a otros sanos. Esta hipótesis se apoya en observaciones de campo en olivares con daños causados por ambos organismos en varias localidades de Andalucía (sur de España).

Por lo tanto, este trabajo pretende evaluar el posible papel de *P. scarabaeoides* como vector de transmisión de *V. dahliae*, el agente causal de la Verticilosis del olivo. Si es así, se explicaría por qué es frecuente encontrar viejos olivares (más de 60 años) afectados por VO, cuando estos olivares se establecieron en un suelo libre del patógeno y, aparentemente, fuera de la influencia del aporte externo de inóculo de *V. dahliae* por cualquiera de los medios de dispersión conocidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el periodo de Mayo de 2009 a Abril de 2012 se llevaron a cabo tres experimentos en condiciones de campo y en condiciones controladas, en un umbráculo del Campus Universitario de Rabanales de la Universidad de Córdoba, España.

1. Experimento en condiciones de campo (Experimento I).

El Experimento I consistió en una inspección y muestreo de campo con el fin de recoger material vegetal de plantaciones de olivo de árboles afectados por la Verticilosis (VO), que mostraran claros síntomas de decaimiento lento o de apoplejía. A su vez, los árboles debían hallarse afectados por ataques de barrenillo, mostrando evidentes orificios en la corteza de las ramas o troncos correspondientes a orificios de entrada (galerías de puesta) de *P. scarabaeoides*.

1.1. Muestreo de material vegetal afectado.

El muestreo se realizó en cuatro plantaciones afectadas por ambos agentes en la provincia de Córdoba (municipios de Almodóvar, Montilla y Santaella) y Jaén (municipio de Andújar) (Tabla 34 y Figura 36). Las muestras recogidas en los campos mencionados se usaron para comprobar la presencia del patógeno sobre el vector potencial (el barrenillo). Asimismo, las muestras se emplearon como fuente para extraer adultos del escolítido *P. scarabaeoides* y ser usados en los Experimentos II y III, que se describirán a continuación.

La toma de muestras en los campos seleccionados se realizó durante los meses de Abril y Mayo. En cada campo se seleccionaron 12 árboles de los que se tomaron de 3 a 6 ramas y/o troncos (de entre 8 y 15cm de diámetro) por olivo (Tabla 34 y Figura 36).

Tabla 34. Muestreos de ramas de olivo recogidas en campo y utilizadas en los experimentos.

<i>Fecha de recogida</i>	<i>Provincia</i>	<i>Localidad</i>	<i>Síntomas</i>		<i>Experimento</i>
			<i>Verticilosis</i>	<i>Phloeotribus scarabaeoides</i>	
Abril 2009	Jaén	Arjona	No	Si	I
Mayo 2009	Córdoba	Santaella	Si	Si	I
Mayo 2009	Córdoba	Montilla	No	Si	I
Mayo 2010	Córdoba	Montilla	No	Si	II
Abril 2011	Córdoba	Almodóvar	Si	Si	II
Abril 2012	Córdoba	Almodóvar	Si	Si	III
Mayo 2012	Córdoba	Almodóvar	Si	Si	III

**Figura 36.** Recogida de ramas de olivo de árboles atacados por *Phloeotribus scarabaeoides* y/o con síntomas de Verticilosis.

1.2. Detección del patógeno *Verticillium dahliae* en el material vegetal.

La infección por *V. dahliae* en el material vegetal recogido se confirmó mediante aislamientos microbiológicos, empleando el medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA). Se eligieron al azar 16 ramas que procedían de árboles de distintos olivares con aparentes síntomas de Verticilosis del olivo, se descortezaron y se cortaron de cada rama 3 trozos de pequeño tamaño que se lavaron con agua corriente durante 20 minutos (Figura 37 A, B, C y D). Cada uno de ellos, a su vez, se dividió en trozos más pequeños de los cuales se tomaron seis que se desinfectaron con lejía comercial al 20% durante 40 segundos y se dejaron secar sobre papel de filtro estéril en una cabina de flujo laminar (Figura 37 E y F). Una vez secos,

se sembraron en PDA (Figura 37 G), se incubaron a 24°C en oscuridad y se observaron a partir del quinto o sexto día al microscopio óptico.

Asimismo, la detección del patógeno en los troncos y ramas recogidos se realizó mediante análisis moleculares basados en Nested-PCR (reacción en cadena de la polimerasa anidada), de acuerdo con la metodología de Mercado-Blanco *et al.* (2003).



Figura 37. Aislamiento de *Verticillium dahliae* de las ramas de poda recogidas de plantaciones de olivo atacadas por *Phloeotribus scarabaeoides* y con aparentes síntomas de Verticilosis.

1.3. Recogida de adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* del material vegetal y detección del patógeno en sus tejidos.

Los adultos de *P. scarabaeoides* se obtuvieron a partir de las ramas recogidas en campo, las cuales fueron transportadas al laboratorio de la Unidad de Patología Vegetal del Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, donde fueron introducidas en cajas de plástico (38 x 30 x 14cm) con tapa provista de un orificio cubierto con malla fina que permitía la ventilación. Las cajas se guardaron a temperatura ambiente en el laboratorio (Figura 38 A). A medida que iban emergiendo los adultos (a partir de Junio), se recogían y se guardaban en cajas pequeñas de metacrilato con un poco de aserrín fino de madera (Figura 38 B) para su posterior utilización en los experimentos.



Figura 38. Obtención de Adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* a partir de ramas recogidas de campo.

Con objeto de comprobar si el barrenillo llevaba conidios del hongo *V. dahliae*, se realizaron aislamientos a partir de adultos vivos y muertos emergidos de las ramas. Los aislamientos se llevaron a cabo en condiciones asépticas, en una cámara de flujo laminar. Para ello se recogió una muestra de 100 adultos que fue dividida en dos submuestras de igual número de individuos.

Los adultos de la primera submuestra se destinaron a aislar el hongo de la superficie externa, para lo cual se colocaron 5 adultos por placa Petri de 9cm (Figura 39 A y B) con medio de cultivo de Sabouraud Malta Agar (SMA), un preparado comercial Cultimed al que se le añadió los siguientes antibióticos: 1ml de 0,05 g/ml de Tetracyclina (Sigma Aldrich); 1ml de 0,6 g/ml de Estreptomicina (Sigma Aldrich); 5ml de 0,05 g/ml de Cyclohexamida PB (Panreac); 1ml de 0,1g/ml de Dodina pestanal (Sigma Aldrich).

Los adultos de la segunda submuestra fueron desinfectados superficialmente con lejía comercial al 15% durante 40 segundos, se dejaron secar sobre papel de filtro estéril y posteriormente se trituraron mediante un homogeneizador mecánico con 5ml de agua destilada estéril (Figura 39 C). A partir del triturado inicial se hicieron 3 diluciones de 0.1, 0.01 y 0.001 (Figura 39 D y E), de cada una de las cuales, más la correspondiente al triturado inicial, se tomaron 300µl y se sembraron en una placa Petri con el medio anteriormente descrito (Figura 39 F). Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron en estufa a 24°C±2 en oscuridad (Figura 39 G). A los siete días, las placas fueron observadas al microscopio estereoscópico para comprobar la presencia de estructuras fúngicas características de *V. dahliae* y se realizaron preparaciones para su observación al microscopio óptico.

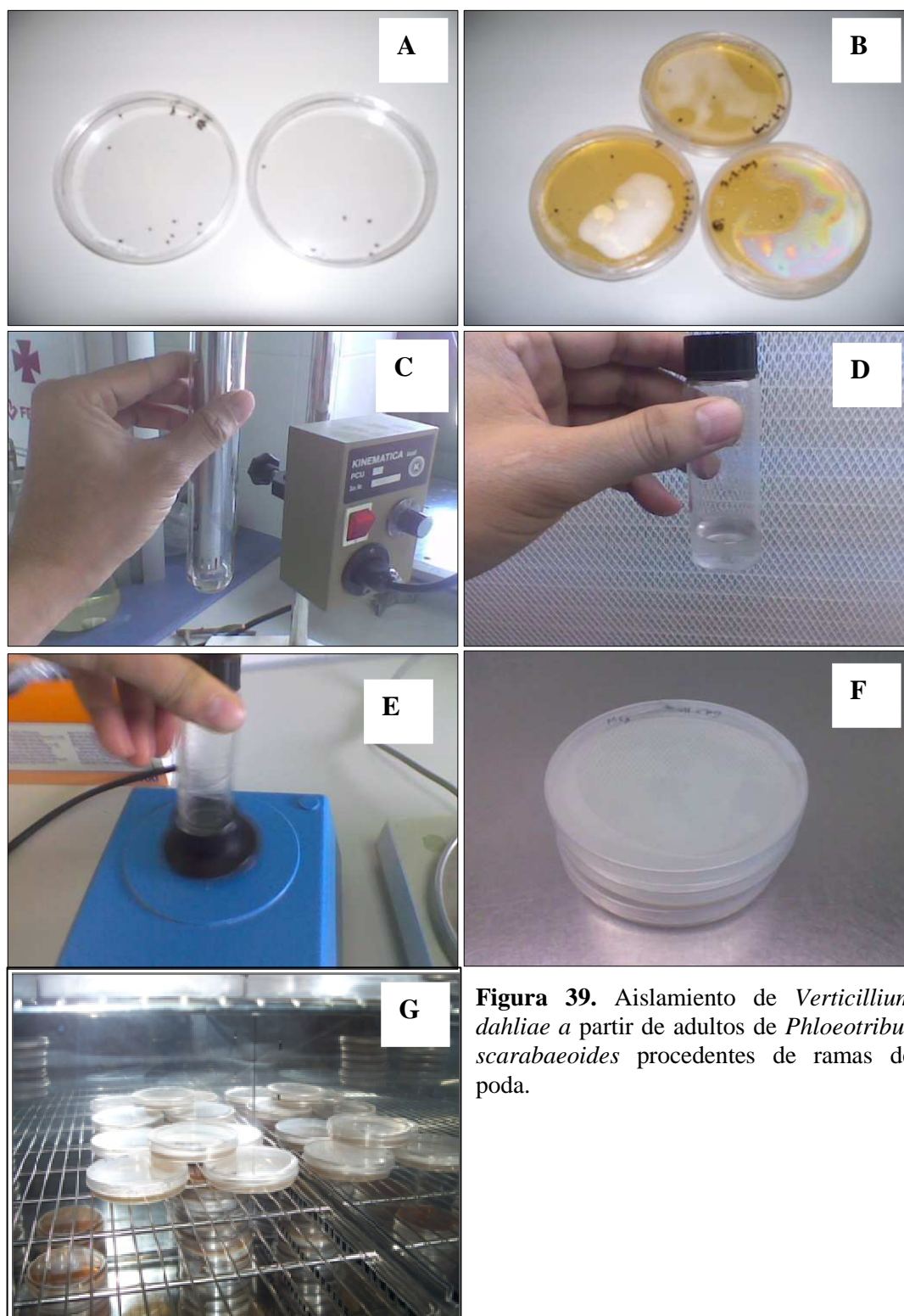


Figura 39. Aislamiento de *Verticillium dahliae* a partir de adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* procedentes de ramas de poda.

2. Experimento en umbráculo 2009-2010 (Experimento II).

Este experimento se realizó durante el periodo de Mayo de 2009 a Marzo de 2010 en un umbráculo del Campus Universitario de Rabanales y consistió en la exposición de plantas de olivo en recintos cubiertos por tela mosquitera a adultos de barrenillo inoculados con *V. dahliae*.

2.1. Material vegetal.

En el Experimento II se utilizaron árboles de la variedad Picual de 2,5 años de edad y 1,6 - 2,0m de altura” (Figura 40), cultivar susceptible a la VO (López-Escudero *et al.*, 2004 y 2007; Martos-Moreno *et al.*, 2006). Las plantas procedían de un vivero comercial (Villanueva del Duque, Córdoba, España), donde se obtuvieron por estaquillado semileñoso bajo nebulización, obteniendo el material de partida de un seto de plantas madres certificadas libres de infecciones por *V. dahliae*.



Figura 40. Árboles del olivo empleadas en los experimentos.

2.2. Diseño experimental y tratamientos.

El Experimento II estuvo compuesto por 2 tratamientos.

2.2.1. Tratamiento 1.

El primer tratamiento (T1) estaba compuesto por cuatro grupos de cuatro de los árboles mencionados. Cada grupo de cuatro árboles se cubrió individualmente por una tela mosquitera de fibra de carbono (Figura 41 A), y fueron expuestos a primeros de Mayo de 2010 a 7 ramas afectadas por la VO y dañadas por el barrenillo, de la partida recogida en el Experimento I (Figura 41 B). La hipótesis era que los adultos inocularían los árboles sanos cuando abandonaran las galerías de puesta durante el periodo de Mayo a Junio, supuestamente infestados por conidios de *V. dahliae*, y produjeran orificios de entrada (galerías de alimentación) en sus ramas y/o tronco principal.



Figura 41. Tratamiento 1: Grupos de árboles de olivo libres de infecciones por *Verticillium dahliae* fueron cubiertos individualmente por una tela mosquitera de fibra de carbono (A) y expuestos a ramas de poda infestadas por la Verticilosis y con orificios de entrada de *Phloeotribus scarabaeoides* (B).

2.2.2. Tratamiento 2.

El segundo tratamiento (T2) también estuvo compuesto por cuatro grupos de cuatro plantas similares cubiertas por tela mosquitera, pero en este caso los árboles se expusieron a adultos previamente infestados por el patógeno que fueron liberados dentro de las redes. Para la inoculación de los adultos se empleó el aislado V117 de la colección de aislados del Laboratorio de Patología Vegetal del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba (Blanco-López et al., 1989). El patógeno se transfirió desde tubos de PDA, donde se

hallaba conservado a 4°C, a placas de PDA, extendiendo el micelio uniformemente sobre la superficie de cada una de las placas. Las placas se incubaron durante 6 días a 24°C en oscuridad. La infestación de los adultos de *P. scarabaeoides* se realizó encerrado a grupos de 20 adultos durante aproximadamente 7 horas en el interior de un sándwich formado por dos placas abiertas de PDA enfrentadas, cerrando el conjunto con parafilm (Figura 42 A y B). En estas placas crecía activamente el patógeno formando profusamente micelio, conidióforos y conidios. Un método de inoculación de insectos con *V. dahliae* ha sido descrito por El-Hamalawi (2008). Posteriormente, los adultos fueron transferidos a cajas de plástico (60 adultos/caja) (Figura 42 C). Las cajas se colocaron abiertas al pie de los árboles dentro de las redes (una caja por árbol, 240 adultos por repetición) (Figura 42 D). La suelta tuvo lugar al atardecer para evitar la posible inactivación de las estructuras fúngicas por la radiación solar.

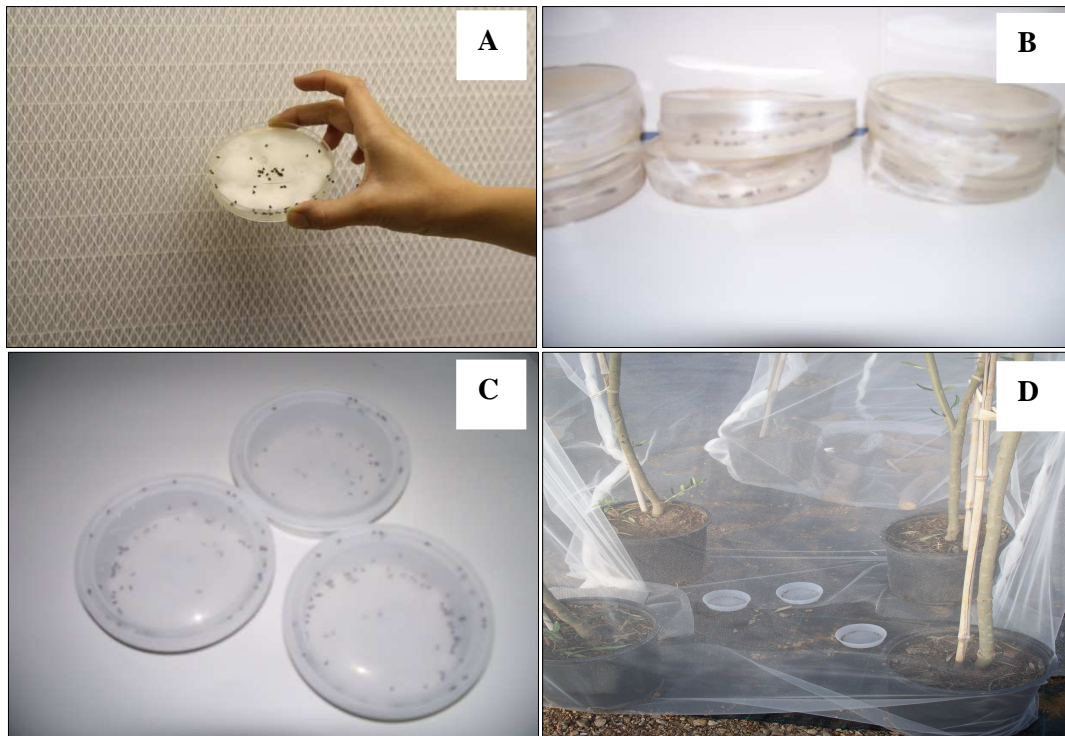


Figura 42. Inoculación de adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* con el hongo *Verticillium dahliae* (A, B y C). Tratamiento 2: Grupos de árboles de olivo libres de infecciones por *Verticillium dahliae* fueron cubiertos individualmente por una tela mosquitera de fibra de carbono y expuestos a adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* previamente inoculados con *Verticillium dahliae* (D).

2.2.3. Tratamientos control.

Por último se incluyó un tratamiento control que consistió en dos grupos de dos árboles sanos. El primer grupo (Control 1) estaba cubierto por una tela mosquitera similar a la empleada en los tratamientos anteriores y fue expuesto a cinco de las ramas recogidas en el Experimento I que mostraban agujeros de entrada (galerías de puesta) de *P. scarabaeoides* pero que se hallaban libres de infecciones por *V. dahliae* (Figura 43 A). Este control sirvió para estimar el grado de infestación y daño provocado por *P. scarabaeoides* a los árboles. Un segundo grupo (Control 2) permaneció sin cubrir y no fue expuesto a adultos del barrenillo o a ramas afectadas por éste, y fue usado para confirmar que las plantas estaban libres de infecciones por el patógeno (Figura 43 B).



Figura 43. Control 1: Grupo de dos árboles de olivo libres de infecciones por *Verticillium dahliae* fueron cubiertos por una tela mosquitera y expuestos a ramas de poda con orificios de entrada de *Phloeotribus scarabaeoides* y libres de Verticilosis (A). Control 2. Grupo de dos árboles de olivo libres de *Verticillium dahliae* sin cubrir y no expuestos a adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* o a ramas afectadas por éste y libres de Verticilosis (B).

2.2.4. Evaluación de los daños, de la enfermedad y de las infecciones.

En Julio, antes de proceder a la recogida de muestras y con objeto de cuantificar el grado de infestación por el barrenillo, se realizó un recuento del número total de orificios de entrada de cada planta producidos por los nuevos adultos procedentes tanto de las ramas o de adultos inoculados que habían sido ofrecidos a los árboles sanos.

Así mismo, durante los meses siguientes a la inoculación mediante adultos de barrenillo (Julio a Septiembre de 2009), los árboles se inspeccionaron periódicamente para identificar síntomas de VO, tales como marchitez, clorosis, necrosis de hojas y brotes y/o defoliación.

En Septiembre de 2009, las ramas afectadas por barrenillo que habían sido usadas como fuente de inóculo de adultos del insecto para las plantas sanas se retiraron de las redes. En ese momento, los adultos estaban abandonando las galerías de las plantas sanas iniciales en las que se habían estado alimentando durante el verano, y se hallaban buscando nuevos árboles para hacer nuevas galerías de alimentación. Por ello, al retirar las ramas afectadas empleadas como fuente de inóculo, se forzó a los adultos, como única alternativa, a producir las nuevas galerías de alimentación de nuevo en los mismos árboles.

Desde Septiembre de 2009 a Marzo de 2010, se realizaron muestreos mensuales consistentes en recoger 3 ramas por cada árbol para contar el número de galerías de alimentación (Figura 44 A, B, C y D). El muestreo sólo se realizó en árboles con un elevado número de orificios de entrada, rechazando aquellos otros que presentaban poco daño. De esta forma, se recogieron un total de 6, 42 y 24 ramas de 2, 14 y 8 árboles del Control 1, T1 y T2, respectivamente. De este material vegetal se extrajeron periódicamente adultos del *P. scarabaeoides* de las galerías de alimentación (Figura 44 E). El objetivo fue comprobar si los insectos estaban interna o externamente infestados por *V. dahliae* y/o si las ramas se habían infectado por el inóculo del patógeno presumiblemente transmitido a los árboles sanos por los escolítidos. Para ello, se realizaron análisis moleculares y microbiológicos de los tejidos de plantas y de los adultos de barrenillo extraídos usando la misma metodología descrita en los apartados anteriores.

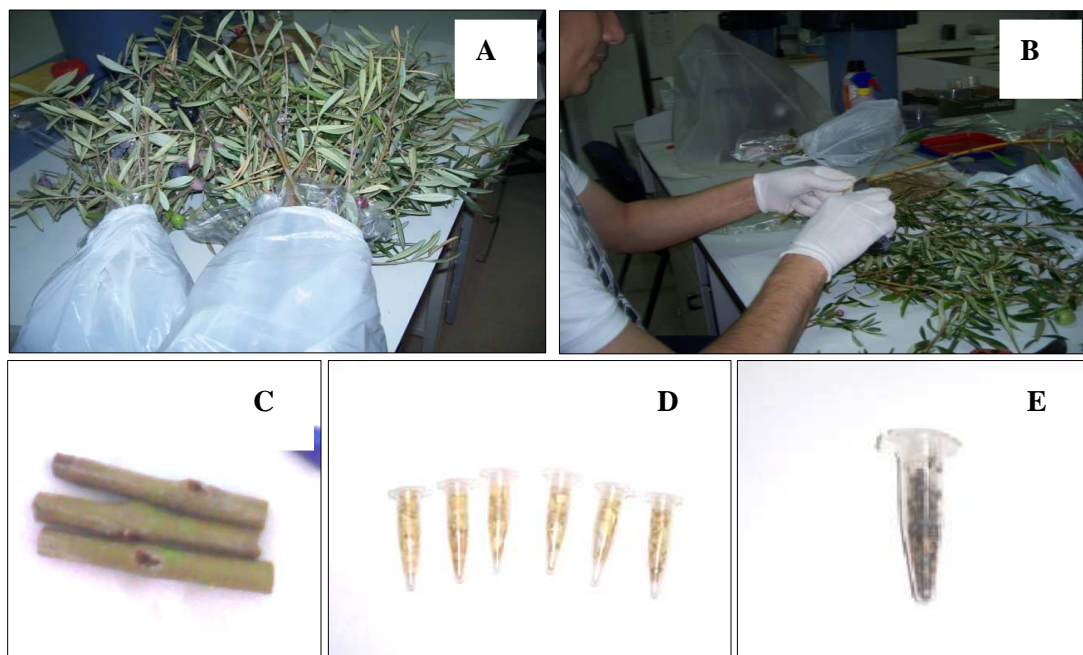


Figura 44. Material vegetal muestreado mensualmente en el experimento II para comprobar si los adultos de barrenillo extraídos de su interior se hallaban infestados interna o externamente por *Verticillium dahliae*.

3. Experimento en umbráculo 2010-2012 (Experimento III).

El Experimento III se realizó durante el período comprendido entre Abril de 2010 y Marzo de 2012 y en él se incluyeron tres tratamientos. Para este experimento se continuaron empleando parte de las plantas del Experimento II y además se usaron otras nuevas con las mismas características y del mismo origen que las anteriores.

3. 1. Diseño experimental y tratamientos.

Los dos primeros tratamientos (T3 y T4) se establecieron en Abril de 2010, mientras que el tercero (T5) comenzó en Abril de 2011.

3.1.1. Tratamiento 3.

Para el primer tratamiento (T3) se escogieron 20 árboles al azar de los tratamientos T1 y T2 del Experimento II y se colocaron dentro de una nueva red de tela mosquitera. Allí fueron inoculados mediante inyección al tronco con 50ml de una suspensión de 10^5

conidios/ml del mencionado aislado V117 de *V. dahliae* de acuerdo con la metodología descrita por López-Escudero *et al.* (2007) (Figura 45 A, B y C).

Para producir el inóculo del patógeno, en la cámara de flujo laminar se vertieron 15 ml de agua destilada estéril sobre cada placa de PDA donde había estado creciendo activamente el patógeno durante 6 días a 24°C. Mediante un asa de vidrio triangular estéril, el micelio se frotó suavemente hasta obtener una suspensión de conidios y micelio que se filtro a través de una doble gasa estéril, obteniéndose finalmente una suspensión de conidios muy concentrada en un matraz de vidrio estéril. A continuación, la suspensión se homogeneizó con la ayuda de agitador magnético y su concentración se ajustó, empleando para la titulación un hematocímetro (cámara de Neubauer), a la concentración de 10^5 conidios/ml.

En Mayo de 2010, cuatro semanas después de la inoculación, los árboles fueron expuestos a 30 ramas de poda de olivo con galerías de reproducción del *P. scarabaeoides* (Figura 45 D), procedentes de la plantación de olivar de Montilla (Tabla 34). Los adultos comenzaron a salir a principios de Junio de 2010. El objetivo de estas inoculaciones fue favorecer la colonización de los tejidos por el patógeno *V. dahliae*, así como aumentar la población del barrenillo en las ramas y brotes de las plantas. También en Mayo de 2010 se realizaron muestreos del material vegetal para confirmar la presencia del patógeno *V. dahliae* en los árboles inoculados mediante aislamientos microbiológicos en medio de cultivo PDA. Durante los siguientes meses, los árboles fueron periódicamente inspeccionados para evaluar los síntomas de VO y los daños ocasionados por los adultos del escolítido. En Septiembre de 2010 se retiraron las ramas de poda de las telas mosquiteras para forzar a los adultos del barrenillo a volver a entrar en los árboles inoculados.

En Octubre de 2010 los árboles de este tratamiento fueron de nuevo inoculados mediante inyección al tronco, siguiendo la misma metodología descrita anteriormente para el mes previo de Abril. Al mismo tiempo se introdujeron dentro de la red seis nuevas plantas de olivo sanas, similares a las inicialmente usadas en el Experimento II y adquiridas en el mismo vivero comercial, siendo distribuidas entre los árboles inoculados (Figura 45 E). El objetivo de la introducción de estos árboles fue exponerlos a adultos de barrenillo que podrían proceder de galerías de alimentación de los árboles inoculados con altas concentraciones de *V. dahliae*. Igual que en la primera inoculación, en Noviembre del 2010 se realizó un muestreo de ramas para confirmar la presencia de *V. dahliae* en las plantas inoculadas. De nuevo, la

hipótesis era que los adultos que habían pasado el verano dentro de las plantas inoculadas y que estaban abandonado en esos momentos las galerías de alimentación, serían capaces de transmitir al patógeno a nuevos árboles sanos en su deseo de construir nuevas galerías de alimentación en sus tejidos. En Noviembre de 2010, se realizaron aislamientos microbiológicos en placas de PDA de los tejidos afectados de los árboles de este tratamiento para confirmar la presencia del patógeno en su interior.

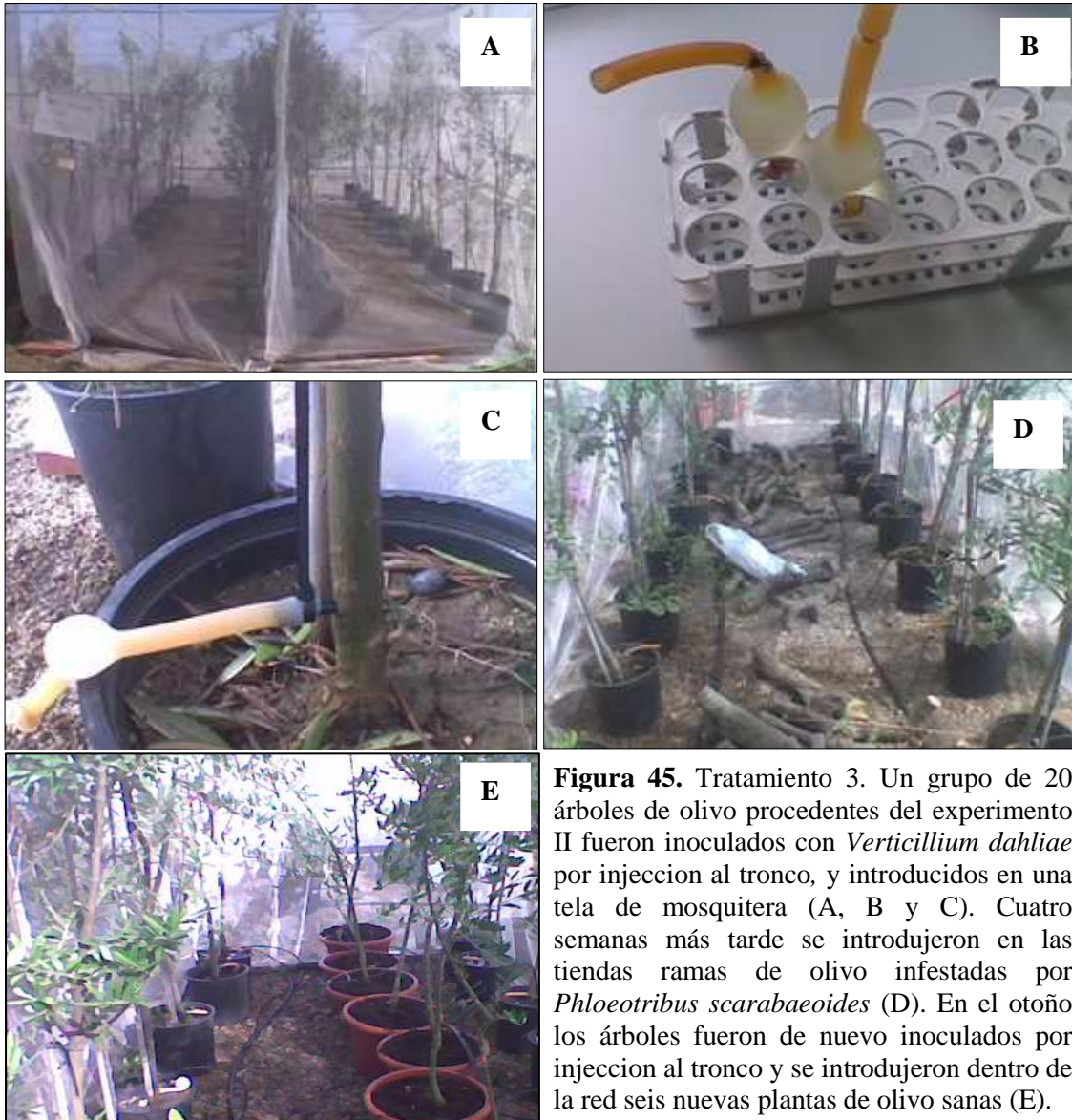


Figura 45. Tratamiento 3. Un grupo de 20 árboles de olivo procedentes del experimento II fueron inoculados con *Verticillium dahliae* por inyección al tronco, y introducidos en una tela de mosquitera (A, B y C). Cuatro semanas más tarde se introdujeron en las tiendas ramas de olivo infestadas por *Phloeotribus scarabaeoides* (D). En el otoño los árboles fueron de nuevo inoculados por inyección al tronco y se introdujeron dentro de la red seis nuevas plantas de olivo sanas (E).

3.1.2. Tratamiento 4.

El segundo tratamiento del Experimento III (T4) también consistió en un grupo de 20 árboles escogidos al azar de entre los árboles empleados en los tratamientos T1 y T2 del Experimento II. Estos 20 árboles se introdujeron en Abril de 2010 en una nueva red de tela mosquitera. Allí, fueron expuestos durante Junio de 2010 a 420 adultos vivos de *P. scarabaeoides* (Figura 46 A).

Estos adultos habían sido extraídos de ramas y troncos dañados por *P. scarabaeoides*, recolectados en la plantación de olivar de Montilla (Tabla 34) y fueron infestados artificialmente con *V. dahliae* de dos formas diferentes. La mitad de los adultos fueron infestados siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Experimento II, usando un sándwich formado por dos placas de PDA enfrentadas conteniendo cultivos activos de *V. dahliae*. La otra mitad se infestó sumergiendo a los adultos durante 40 segundos en una suspensión de 10^8 conidios/ml del aislado V117 del patógeno.

Después de su liberación, los escolítidos invadieron los 20 árboles de la red, produciendo en ellos nuevos orificios de entrada (galerías de alimentación) en donde pasaron el verano alimentándose. Con el mismo objetivo mencionado antes, durante Octubre de 2010, se introdujeron en la red de este tratamiento T4 cuatro nuevos árboles sanos repartidos entre los árboles que habían sido expuestos a adultos de barrenillo inoculados con el patógeno (Figura 46 B). El propósito fue comprobar si los adultos, después de haber realizado galerías de alimentación en los árboles viejos, podrían favorecer la colonización del patógeno y luego, cuando se trasladaran para alimentarse a las plantas sanas ofrecidas, serían capaces de transmitir la enfermedad.

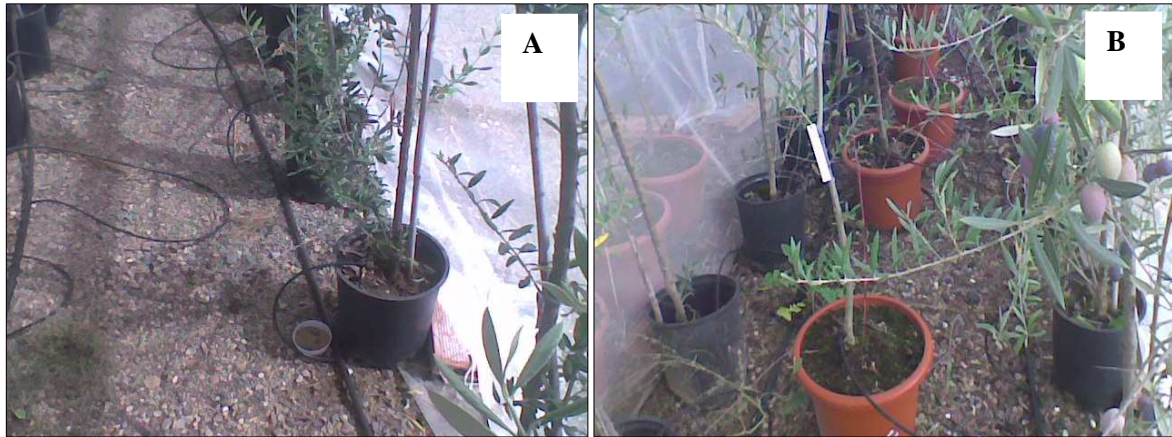


Figura 46. Tratamiento 4: Un grupo de 20 árboles de olivo procedentes del experimento II se introdujeron en una tela mosquitera y fueron expuestos a adultos vivos de *Phloeotribus scarabaeoides* inoculados artificialmente con *Verticillium dahliae* (A). En el otoño se introdujeron en la red cuatro nuevos árboles sanos de olivo (B).

3.1.3. Tratamiento 5.

El tratamiento (T5), consistió en exponer dentro de una nueva red de tela mosquitera a ocho árboles sanos a 30 ramas de olivo, recolectadas de plantas afectadas por barrenillo y que mostraban síntomas claros de VO en Abril de 2011 de la plantación de olivo situada en Almodóvar (Córdoba) (Tabla 34). Estas ramas se retiraron en Septiembre del mismo año para forzar a los adultos del barrenillo a volver a entrar en los árboles (Figura 47).



Figura 47. Tratamiento 5: Grupo de 8 árboles de olivo libres de Verticilosis se introdujeron en una tela mosquitera y fueron expuestos a ramas de poda infestados por la Verticilosis y con orificios de entrada de *Phloeotribus scarabaeoides*.

3.1.4. Tratamiento control.

Como tratamiento de control general para el Experimento III se emplearon en Octubre de 2010 cuatro árboles sanos no expuestos al barrenillo, para confirmar a lo largo del experimento el adecuado estado sanitario de las plantas utilizadas respecto a infecciones de *V. dahliae* (Figura 48 C).



Figura 48. Control. Grupo de 4 árboles de olivo libres de *Verticillium dahliae* sin cubrir y no expuestos a adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* o a ramas afectadas por éste.

3.1.5. Evaluación de los daños, de la enfermedad y de las infecciones.

Como en el experimento anterior, a lo largo del periodo experimental se realizaron observaciones visuales del desarrollo de síntomas de la Verticilosis en todos los tratamientos del Experimento III.

En Junio de 2011, una nueva generación de escolítidos adultos salió de las ramas de los árboles e invadió los brotes y ramas de cualquiera de los árboles que se hallaban dentro de la red correspondiente a los diferentes tratamientos. En consecuencia, en Julio de 2011, se contabilizó el número de orificios de entrada (de alimentación y de puesta) producidos en las ramas de los árboles.

Asimismo, se realizaron muestreos de los árboles sanos de los tres tratamientos (T3, T4 y T5) durante Noviembre de 2011 y al inicio de la primavera siguiente, en Marzo de 2012. Para ello se empleó la misma metodología descrita antes para el Experimento II. Así, en estas muestras se contabilizó el número de orificios de entrada (galerías de alimentación y puesta). Igualmente, las infecciones causadas por *V. dahliae* fueron evaluadas en este material vegetal mediante aislamientos microbiológicos en PDA y detecciones moleculares mediante análisis PCR, con las metodologías ya descritas. Por último, también se hizo lo mismo para los adultos de barrenillo recuperados de las galerías de los brotes y ramas muestreados.

4. Análisis estadístico de los datos.

Los datos analizados se refieren a un periodo de 4 años. Los valores del número de orificios de entradas debidas a *P. scarabaeoides* se analizaron mediante análisis de la varianza utilizando el programa Statistix 8.0 (Analytical software, 2003). La comparación de medias se realizó según el test de la Diferencia Mínima Significativa (DMS), al nivel de probabilidad del 5% (Steel y Torrie, 1985).

RESULTADOS

1. Presencia de *Verticillium dahliae* en ramas de olivo o en adultos de barrenillo (*Phloeotribus scarabaeoides*) recogidos de árboles que mostraban síntomas de la enfermedad y galerías de puesta en el campo, en el Experimento I.

Verticillium dahliae fue aislado del 20% de las ramas de olivo que mostraban síntomas severos de Verticilosis y claros orificios de entrada correspondientes a galerías de alimentación producidas por el barrenillo, que fueron recolectados de las cuatro plantaciones de olivo inspeccionadas durante Abril y Mayo de 2009.

El patógeno no fue aislado de la superficie externa de los tejidos del tegumento de ninguno de los 250 adultos de escarabajo extraídos de las galerías de puesta de las ramas recolectadas, después de su siembra sobre el medio de cultivo Saboraud Malta Agar suplementado con antibióticos. De la misma forma, el patógeno no se hallaba presente en los tejidos internos de otros 250 adultos de barrenillo observados. La detección molecular del patógeno en adultos del insecto no produjo resultados positivos en ninguno de los casos.

2. Inoculación de árboles de olivo mediante adultos del barrenillo del olivo en el Experimento II.

De los resultados del Experimento II, realizado entre Mayo de 2009 y Marzo de 2010, no se obtuvieron evidencias positivas en relación con la posible transmisión de *V. dahliae* desde ramas de olivos afectadas por la VO a árboles sanos mediante adultos del escolítido. Así, los adultos de barrenillo recuperados de ramas de olivo (T1) o los que fueron inoculados artificialmente con *V. dahliae* (T2) llegaron a producir galerías de alimentación en los árboles sanos introducidos bajo las telas mosquiteras, pero estos árboles no resultaron infectados por el patógeno.

El número de galerías de alimentación por árbol producidas por *P. scarabaeoides* en cada uno de los bloques de los tratamientos de este experimento durante Junio de 2009 se muestra en la Tabla 35. El número medio de galerías de alimentación fue significativamente mayor ($P < 0.0001$) en los árboles del tratamiento T1 que en los del T2, alcanzando valores de

164 y 42 galerías, respectivamente. En el T2, el 70% de los adultos liberados produjeron orificios de entrada en los árboles sanos.

Tabla 35. Número de galerías de alimentación por árbol producidas por adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* en árboles sanos de olivo en el Experimento II desde Mayo a Junio de 2009^a.

<i>Número medio de galerías de alimentación por árbol</i>			
<i>Red (Tela mosquitera) (nº)</i>	<i>Control 1</i>	<i>Tratamiento 1</i>	<i>Tratamiento 2</i>
1	261,8	162,5	31,5
2	-	186,0	37,0
3	-	138,5	58,5
4	-	169,8	42,5
<i>Media</i>	261,8	164,2 a	42,4 b

^a Se dispusieron árboles sanos de olivo en grupos de 2 plantas (Control 1) o de 4 plantas (Tratamientos 1 y 2) dentro de redes de tela mosquitera, donde fueron expuestos a adultos del barrenillo. Control 1 = Árboles invadidos por adultos del insecto que provenían de árboles no afectados por la Verticilosis del olivo. Tratamiento 1= Árboles invadidos por adultos del barrenillo procedentes de ramas recogidas de árboles infectados por *Verticillium dahliae*. Tratamiento 2= Árboles invadidos por adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* superficialmente inoculados con *Verticillium dahliae*. Valores medios seguidos por la misma letra no difirieron significativamente según el Test de Mínima Diferencia Significativa Protegida de Fisher ($P = 0,05$).

El número de galerías por rama producidos por *P. scarabaeoides* en cada árbol se evaluó mediante muestreos mensuales realizados entre Septiembre de 2009 a Marzo de 2010, con el objeto de extraer adultos de los tejidos y detectar al patógeno superficialmente o en el interior de los tejidos de los insectos (Tabla 36). La media del número de entradas por rama fue significativamente mayor ($P < 0.0001$) en los árboles del tratamiento T1 (7,7) que en los del T2 (3,5). Los dos árboles control mostraron una media de orificios de entrada de 16,7.

Tabla 36. Número de galerías de alimentación por rama producidas por adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* en árboles sanos de olivo en el Experimento II desde Septiembre de 2009 a Marzo de 2010^a.

<i>Número medio de galerías de alimentación por rama en cada muestreo</i>			
<i>Red (Tela mosquitera) (nº)</i>	<i>Control 1</i>	<i>Tratamiento 1</i>	<i>Tratamiento 2</i>
1	16,7	8,9	1,3
2	-	5,8	1,7
3	-	7,4	4,8
4	-	8,8	2,8
<i>Media</i>	16,7	7,7 a	3,5 b

^a Se dispusieron árboles sanos de olivo en grupos de 2 plantas (Control 1) o de 4 plantas (Tratamientos 1 y 2) dentro de redes de tela mosquitera, donde fueron expuestos a adultos del barrenillo. Control 1 = Árboles invadidos por adultos del insecto que provenían de árboles no afectados por la Verticilosis del olivo. Tratamiento 1= Árboles invadidos por adultos del barrenillo procedentes de ramas recogidas de árboles infectados por *Verticillium dahliae*. Tratamiento 2= Árboles invadidos por adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* superficialmente inoculados con *Verticillium dahliae*. Valores medios seguidos por la misma letra no difirieron significativamente según el Test de Mínima Diferencia Significativa Protegida de Fisher ($P = 0,05$).

Durante el periodo comprendido entre Septiembre de 2009 a Marzo de 2010 no se observaron síntomas de la VO en las plantas de olivo inoculadas con *V. dahliae* usando como vector a los adultos de barrenillo. Además, *V. dahliae* no fue detectado, empleando las técnicas microbiológicas y moleculares mencionadas, en ninguna de las muestras estudiadas recogidas de árboles sanos y adultos del barrenillo extraídos de las galerías de alimentación producidas en las ramas.

3. Inoculación árboles de olivo mediante adultos del barrenillo del olivo en el Experimento III.

En el tratamiento T3, la primera inoculación de árboles con *V. dahliae* mediante inyección al tronco no produjo síntomas consistentes de Verticilosis durante el verano de 2010. Además, el patógeno no fue detectado en las ramas muestreadas de los árboles inoculados en Mayo de 2010, revelando que la colonización de los tejidos de las plantas producida por la primera inoculación no había sido suficientemente extensa. Por el contrario, cuando la inoculación se repitió en Octubre de 2010, 13 de los 20 árboles inoculados mostraron síntomas típicos de necrosis y defoliación en verde después de la inoculación. En

cualquier caso, los aislamientos realizados de los tejidos afectados en placas de medio PDA sólo confirmaron la presencia del patógeno en 4 de los 13 árboles que mostraban síntomas.

Las ramas y brotes de los seis árboles sanos que se introdujeron en la red del tratamiento T3 fueron perforados por los adultos de barrenillo que provenían de los árboles inoculados durante el período Octubre 2010 a Junio de 2011. Lo mismo ocurrió con los cuatro árboles sanos introducidos en la tela mosquitera del tratamiento T4 que fueron en este caso perforados por adultos de sus respectivos árboles no inoculados, que habían sido inoculados por *V. dahliae* durante el mismo período. Finalmente, los ocho árboles sanos incluidos en la red del tratamiento T5 resultaron severamente dañados por los adultos del escolítido que provenían de ramas afectadas por VO, recogidas de una plantación de olivo del término de Almodóvar (provincia de Córdoba).

El número total de estas galerías, de alimentación y de puesta, se contó al final de Junio de 2011 (Tabla 37). Los resultados mostraron diferencias significativas ($P < 0.005$) entre los tratamientos, que variaron entre 50,0 (T5) y 32,8 (T4) galerías.

Tabla 37. Número de galerías de alimentación y puesta producidas por adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* en árboles sanos de olivo en el Experimento III desde Octubre de 2010 a Junio de 2011^a.

<i>Número de galerías por árbol</i>			
<i>Árbol (n°)</i>	<i>Tratamiento 3</i>	<i>Tratamiento 4</i>	<i>Tratamiento 5</i>
1	45	26	45
2	40	34	52
3	47	35	56
4	37	36	60
5	43	-	44
6	37	-	42
7	-	-	61
8	-	-	40
Media	41,5b	32,8c	50,0a

^a Tratamiento 3 = 20 árboles inoculados por inyección al tronco con *Verticillium dahliae* dispuestos en una red de tela mosquitera, en la cual se habían introducido 30 ramas de olivo afectadas por *Phloeotribus scarabaeoides*. A continuación, se introdujeron dentro de la red 6 árboles sanos de olivo. Tratamiento 4 = 20 árboles inoculados por inyección al tronco con *Verticillium dahliae* dispuestos en una red de tela mosquitera, dentro de la cual se liberaron 420 adultos del barrenillo artificialmente infestados con *Verticillium dahliae*. A continuación se introdujeron dentro de la red 4 árboles sanos de olivo. Tratamiento 5 = 8 árboles sanos de olivo en una red en la cual se introdujeron 30 ramas de olivo severamente dañadas por *Phloeotribus scarabaeoides* e infectadas por *Verticillium dahliae*. Valores medios seguidos por la misma letra no difirieron significativamente según el Test de Mínima Diferencia Significativa Protegida de Fisher ($P = 0,05$).

Ninguno de los árboles sanos introducidos en las redes de los tratamientos T3 a T5 mostró síntomas a lo largo del período de observación del Experimento III (Octubre de 2010 a Marzo de 2012).

Los muestreos de ramas afectadas de los árboles sanos de los tres tratamientos de este experimento se llevaron a cabo durante el período comprendido entre Noviembre de 2011 y Marzo de 2012. El número medio de orificios o galerías (de alimentación y de puesta) por rama mostró diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los tratamientos, alcanzando 5,5, 3,4 y 8,2 orificios en T3, T4 y T5, respectivamente (Tabla 38). *Verticillium dahliae* no fue detectado mediante los aislamientos en PDA o empleando técnicas de PCR en ninguna de las muestras estudiadas recogidas de los árboles sanos iniciales, demostrando que las plantas no estaban infectadas. Asimismo, el patógeno no pudo ser aislado de los tejidos externos o internos de ninguno de los adultos de *P. scarabaeoides* extraídos de las galerías de las ramas muestreadas.

Tabla 38. Número de galerías de alimentación y de puesta por rama producidas por *Phloeotribus scarabaeoides* en árboles sanos de olivo en el Experimento III desde Noviembre de 2011 a Marzo de 2012^a.

Número medio de galerías por rama en cada muestreo			
Árbol (nº)	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
1	6,0	3,0	6,3
2	6,0	4,0	9,0
3	6,0	3,0	8,0
4	3,0	3,7	8,3
5	6,0	-	8,7
6	5,7	-	8,3
7	-	-	9,0
8	-	-	8,0
Media	5,5b	3,4c	8,2a

^a Tratamiento 3 = 20 árboles inoculados por inyección al tronco con *Verticillium dahliae* dispuestos en una red de tela mosquitera, en la cual se habían introducido 30 ramas de olivo afectadas por *Phloeotribus scarabaeoides*. A continuación, se introdujeron dentro de la red 6 árboles sanos de olivo. Tratamiento 4 = 20 árboles inoculados por inyección al tronco con *Verticillium dahliae* dispuestos en una red de tela mosquitera, dentro de la cual se liberaron 420 adultos del barrenillo artificialmente infestados con *Verticillium dahliae*. A continuación se introdujeron dentro de la red 4 árboles sanos de olivo. Tratamiento 5 = 8 árboles sanos de olivo en una red en la cual se introdujeron 30 ramas de olivo severamente dañadas por *Phloeotribus scarabaeoides* e infectadas por *Verticillium dahliae*. Valores medios seguidos por la misma letra no difirieron significativamente según el Test de Mínima Diferencia Significativa Protegida de Fisher ($P = 0,05$).

DISCUSIÓN

Este estudio es la primera investigación dirigida a evaluar el papel del barrenillo del olivo, *Phloeotribus scarabaeoides*, como vector potencial de *Verticillium dahliae* causante de la Verticilosis del olivo (VO). La hipótesis inicial se basó en las actividades relacionadas con el ciclo biológico de este coleóptero de la familia Scolytidae, cuya naturaleza y desarrollo puede sugerir que podría transportar conidios infectivos del patógeno cuando se traslada de árboles afectados por VO a otros sanos para realizar en ellos las galerías de alimentación o apareamiento.

Varias especies de hongos, que provocan distintas enfermedades en los árboles, pueden ser eficientemente transmitidos por insectos xilófagos (Webber y Gibbs, 1989). La mayoría de los hongos asociados con los escolítidos son Ascomycetos. Los géneros más frecuentes son *Ophiostoma*, *Ceratocystis*, *Ceratocystiopsis* y los géneros anamorfos *Graphium* y *Leptographium* (Harrington, 1993; Upadhyay, 1993; Wingfield *et al.*, 1997). No obstante, sólo pocos casos están directamente relacionados con las enfermedades vasculares, como es el caso de la enfermedad del olmo holandés causada por *Ophiostoma ulmi*, que se transmite por *Scolytus* spp. (Webber, 2004). Por otro lado, *Ceratocystis fimbriata*, uno de los patógenos vasculares más virulentos y económicamente importante en muchos cultivos agrícolas y árboles forestales (Kile, 1993), está asociado frecuentemente con escolítidos en *Populus* (Hinds, 1972) y *Prunus* (Moller y Vay, 1968). En algunos casos se señala que especies de barrenadores ambrosiales transportan esporas del hongo *Ceratocystis fimbriata* sobre el cuerpo o en el tracto digestivo (Iton, 1966 y 1960).

En la presente investigación los primeros intentos de encontrar alguna evidencia que señalase a *P. scarabaeoides* como un vector de *V. dahliae* no tuvieron éxito, a pesar de que el muestreo fue suficientemente amplio y los adultos fueron recogidos de árboles atacados por los dos agentes (el patógeno y el posible vector) en distintos olivares. Los brotes, ramas y troncos fueron recolectados de parcelas con una alta incidencia de la enfermedad y de árboles intensamente colonizados por el barrenillo. Además, los muestreos se realizaron en Abril y Mayo, el momento más favorable para el desarrollo de la enfermedad en nuestras condiciones, hecho que apoya de forma clara los resultados negativos obtenidos.

Pese a la falta de evidencias, las investigaciones continuaron y los experimentos se llevaron a cabo durante un período razonablemente largo (de Marzo 2009 hasta Mayo 2012), con el fin de explorar en varios años todas las posibilidades de inoculación del patógeno por el insecto, cuando su ciclo biológico coincide con el período más favorable para la infección y el desarrollo de síntomas de la Verticilosis. Estos períodos fueron principalmente primavera, principios del verano y otoño.

El diseño experimental y el uso de mosquiteros han permitido el aislamiento de los tratamientos, de manera que el movimiento de los adultos del escoltído entre los árboles sanos y los artificialmente infectados estaba asegurado. De hecho, la cuantificación de los orificios de entrada causados por el insecto en los brotes de los árboles sanos ha sido un parámetro principal para asegurar que la inoculación de *V. dahliae* podría haber ocurrido de forma efectiva si el insecto hubiese sido capaz de transmitir el patógeno, tal como se deduce de las Tablas 34 a 37. Además, el papel de *P. scarabaeoides* como vector potencial de *V. dahliae* se determinó mediante la evaluación de síntomas de la enfermedad y la presencia del patógeno en los tejidos de olivos invadidos por los insectos. También se buscó la presencia del patógeno en los adultos de barrenillo, tanto en la superficie externa como en el interior del cuerpo, una vez extraídos de las galerías de alimentación o apareamiento en los brotes de olivos infectados por *V. dahliae* que mostraban síntomas graves de Verticilosis.

La presencia de galerías de alimentación en las ramas muestreadas mensualmente durante el período comprendido entre Septiembre de 2009 y Marzo de 2010 (Experimento II), mostró que el insecto estaba activo y podía pasar de un árbol a otro, ya que el número medio de orificios de entrada (Tabla 36) fue comparable con el valor obtenido inicialmente (Tabla 35). Sin embargo, la ausencia de síntomas de la enfermedad e infecciones en los árboles, así como de barrenillos adultos contaminados, no mostraron que la inoculación se hubiera producido.

En el tercer experimento (Experimento III), los árboles de olivo utilizados en los tratamientos T3 y T4 fueron inoculados artificialmente dos veces por inyección del tallo con *V. dahliae*. El objetivo fue infectar consistentemente los tejidos de la planta en los que *P. scarabaeoides* excavaría las galerías de apareamiento y alimentación, para después ofrecerles nuevos árboles de olivos sanos. La primera inoculación no produjo síntomas consistentes de VO, probablemente debido a las altas temperaturas registradas a principios de verano, que

habrían impedido una colonización extensa de los tejidos del árbol por el patógeno. Además, la inoculación por inyección del tallo resultó, en general, en una colonización poco intensa, muy diferente de lo que normalmente se obtiene cuando se inoculan plantas más pequeñas mediante inmersión radicular en condiciones controladas (López-Escudero *et al.*, 2004 y 2007). Sin embargo, la segunda inoculación, llevada a cabo en Octubre de 2010, causó síntomas típicos de VO (necrosis y defoliación de hojas verdes de los árboles).

En este experimento, el número de las galerías de alimentación y apareamiento causadas por los adultos de *P. scarabaeoides* (Tablas 37 y 38) mostró una tendencia similar a lo que ocurrió en el Experimento II, en función de la forma de liberación de los insectos. Sin embargo, aunque variable, se piensa que el número de orificios de entrada causados por el insecto en cualquiera de los tres tratamientos de este experimento fue suficiente para poder transmitir el patógeno, en el caso de que el barrenillo fuera un vector eficaz de la enfermedad.

Bajo las condiciones experimentales descritas, los olivos sanos expuestos a *P. scarabaeoides* no mostraron síntomas de VO en ninguno de los casos. Asimismo, el patógeno no pudo ser aislado de los tejidos de ramas en donde los insectos habían realizado galerías, ni de los tejidos de los adultos de insectos extraídos de las galerías.

Las informaciones sobre la transmisión de *V. dahliae* por insectos son muy escasas. La bibliografía apenas describe algunos casos aislados. Algunos incluso no son lo suficientemente concluyentes, como la posible transmisión de la Verticilosis del albaricoque por el escarabajo de la corteza *Scolytus rugulosus* (Popushoi y Kulik, 1976) o el de la Verticilosis del roble en Italia transmitida por los xilófagos *Scolytus intricatus* (Ratz.) y *Xyleborus dispar* (F.) (Tiberi y Ragazzi, 1998).

Los resultados de esta investigación ponen de manifiesto que el barrenillo del olivo, *P. scarabaeoides*, no es un vector de *V. dahliae* causante de la Verticilosis del olivo en las condiciones experimentales estudiadas. Las causas están probablemente relacionadas con la ineficiencia del insecto en adquirir el inóculo de árboles enfermos (unido a su cuerpo o en el interior de su tracto digestivo), o bien por su incapacidad para el transporte y depósito de conidios viables del patógeno en el sitio adecuado, cerca o dentro de los vasos del xilema, que permita al patógeno establecer la infección.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Interacción *Bactrocera oleae*-*Prolasioptera berlesiana*-*Botryosphaeria dothidea*.

1. Las observaciones de campo ponen de manifiesto que los tres agentes implicados en el Escudete de la aceituna: *Botryosphaeria dothidea*, agente causal del Escudete, el mosquito *Prolasioptera berlesiana* y la mosca del olivo *Bactrocera oleae* se desarrollan de forma paralela.
2. La variedad Gordal es más susceptible al ataque de mosca que las variedades Hojiblanca y Picudo, por lo que en esta variedad se encontró la mayor incidencia de población del mosquito y de Escudete.
3. El mosquito se muestra atraído por la herida de puesta (picada) de la mosca en el fruto, independientemente de que ésta haya depositado o no huevo en su interior.
4. En aceitunas con heridas artificiales, el mosquito elige preferentemente para realizar su puesta las picadas tipo mosca, que fueron receptivas al menos durante las primeras 48 horas, si bien se requiere ampliar el estudio varios días más para determinar hasta cuanto tiempo las picadas están receptivas para la puesta de *P. berlesiana*.
5. La totalidad de las aceitunas que presentan mosquito en el interior de la picadura muestran síntomas de Escudete, siendo la herida imprescindible para el desarrollo de la enfermedad.
6. Las observaciones microscópicas muestran que las hembras del mosquito poseen en los últimos segmentos del abdomen, junto al oviscapto, una cámara o mycangia, en la cual en ocasiones se observaron conidios de *B. dothidea*. Además, los aislamientos en cultivo PDA confirmaron la presencia del hongo en el interior de la hembra del mosquito.
7. La presencia de la mycangia y el aislamiento del hongo en el interior de la hembra del mosquito sugieren una asociación mutualista entre *B. dothidea* y *P. berlesiana* y que este último es un vector del hongo causal del Escudete.

8. La alimentación principal del mosquito es el micelio del hongo *B. dothidea*, que depreda también huevos o larvas neonatas de la mosca del olivo si los encuentra en la herida de puesta y no precisa alimentarse del tejido de la aceituna.
9. Los aislamientos en medio de cultivo PDA muestran que un alto porcentaje de las hembras de *B. oleae* llevan externamente en su cuerpo el hongo *B. dothidea*, cuya identidad fue confirmada mediante PCR. Sin embargo, no hay evidencias de que el Escudete sea transmitido por la mosca.

Interacción *Phloeotribus scarabaeoides*-*Verticillium dahliae*.

1. En los adultos de barrenillo *P. scarabaeoides* emergidos de galerías de reproducción de ramas de olivos con síntomas de Verticilosis en campo, no se detectó en ningún caso, ni externa ni internamente, la presencia de *Verticillium dahliae* en aislamientos de medio de cultivo.
2. En condiciones controladas, la abundancia de los orificios de entrada causados por *P. scarabaeoides* en brotes de olivos sanos indica que el movimiento del insecto, desde árboles inoculados con el hongo, fue suficiente para permitir la inoculación de *V. dahliae* si el insecto hubiese sido capaz de transmitir el patógeno.
3. Las plantas de olivo sanas atacadas por adultos de *P. scarabaeoides* que habían estado en contacto con el hongo no mostraron síntomas de Verticilosis en ninguno de los casos. Asimismo, el patógeno no pudo ser aislado de los tejidos de ramas en donde los insectos habían realizado galerías, ni de los tejidos de los adultos de insectos extraídos de las galerías.
4. De lo anterior se deduce que el barrenillo del olivo, *P. scarabaeoides* no es un vector de *V. dahliae* causante de la Verticilosis del olivo, en las condiciones experimentales estudiadas.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abo Shkeers, F.M. 2010. Evaluación de la resistencia de variedades del banco mundial de germoplasma de olivo (IFAPA, Alameda el Obispo, Córdoba) al patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. Tesis de Fin de Máster de Producción y Protección y Mejora Vegetal, Universidad de Córdoba, España, 13 pp.
- Adair, R.J., Burgess, T., Serdani, M., Barber, P. 2009. Fungal associations in Asphondylia (Diptera: Cecidomyiidae) galls from Australia and South Africa: implications for biological control of invasive acacias. *Fungal Ecology* 2:121-134.
- Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. (5th eds.) Elsevier academic Press. New York, 922 pp.
- Al-Ahmad, M.A., Mosli, M.N. 1993. Verticillium wilt of olive in Syria. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin (OEPP/EPPO)* 23:521-529.
- Aldebis, H.K., Trapero-Casas, A., 2002. Influencia de la variedad y técnicas de cultivo sobre las principales enfermedades del olivar. *Jornadas de Investigación y Transferencia de Tecnología al Sector Oleícola, Libro de Actas*, pp. 178-182.
- Aldebis, H.K., Vargas-Osuna, E. 2003. La mosca del olivo, daños y métodos de lucha. *Vida Rural* 176:42-46.
- Alfaro, A. 2005. Entomología agraria. Los parásitos animales de las plantas cultivadas. Edición de Cándido Santiago Álvarez, Diputación de Soria, pp. 196-198.
- Almeida, R.P.P., Wayadande, A., Shelly, T. 2005. Insect transmission of plant pathogens. *Annals of the Entomological Society of America* 98:755-755.
- Altolaguirre-Obrero, M., López-Pérez, A., Caballero-Jiménez, J.A. 2003. Estrategia alternativa al control de mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Gmelin) mediante “trampa OLIFE”. Ensayos en distintas zonas de la provincia de Córdoba. XI Symposium Científico-Técnico Expoliva, Jaén, Spain, pp. 14-16.

- Alvarado, M. 2004. Plagas y enfermedades del olivo Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, 166 pp.
- Alvarado, M., Civantos, M., Durán, J.M. 2010. Pests. En: Olive growing, (Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. eds.), Mundiprensa y Junta de Andalucía, Madrid, 756 pp.
- Anónimo. 1999. Real decreto 1678/1999 de 29 Octubre (BOE 276 18 de Noviembre 1999).
- Arambourg, Y. 1984. La fauna entomológica del olivo. *Olivae* 4:14-21.
- Arambourg, Y. 1986. Traite d'entomologie oléicole. Conseil Oléicole International, Madrid, 360 pp.
- Arbogast, M., Powelson, M.L., Cappaert, M.R., Watrud, L.S. 1999. Response of six potato cultivars to amount of applied water and *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89:782-788.
- Armendáriz, I., Perez-Sanz, I., Nicolas, J., Aparico, E., Juarez, J.S., Miranda, L. 2009. Cinco años de seguimiento de mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Gmelin) en los arribes del duero. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 35:219-229.
- Augustinos, A.A., Stratikopoulos, E.E., Zacharopoulou, A., Mathiopoulos, K.D. 2002. Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Molecular Ecology Notes* 2: 278-280.
- Ayquipa, A., Gaspar, E., José, D., Sirlopu, R., Eladio, D., Angulo, A. 1979. Influencia de *Diatraea saccharalis* en el brotamiento y macollamiento de la caña de azúcar. *Revista Peruana de Entomología* 22:33-35.
- Ayoutantis, A.J., Pelekassis, E.D., Argyriou, L.C., Mourikis, P.A., Tsacas, L.E. 1954. Rapport sur le travaux experimentaux de lutte contre le *Dacus* a Rovies (Eubée) pendant l'année 1953. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki* 8:2-75.

- Balachowsky, A.S. 1949. Coleopteres Scolytides. Faune de France, Paris 50:275-279.
- Barbara, D.J., Clewes, E. 2003. Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there?. Molecular Plant Pathology 4:297-305.
- Batra, L.R., Lichtwardt, R.W. 1963. Association of fungi with some insect galls. Journal of the Kansas Entomological Society 36:262-278.
- Batra, L.R. 1972. Ectosymbiosis between ambrosia fungi and beetles. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology 2:165-169.
- Baumann, P., Moran, N.A., Baumann, L. 2006. Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. Bioscience 48: 295-304.
- Beaver, R.A. 1989. Insect–fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. En: Insect-fungus interactions, (Wilding, F.L., Collins, N.M., Hammond, R.M., Webber, J.F. eds.), Academic press, London, 121-143 pp.
- Beckman, C.H. 1987. The nature of wilt disease in plants. American Phytopathological Society, St Paul Minnesota USA, 175 pp.
- Bejarano-Alcázar, J. 2008. Efecto de las cubiertas vegetales sobre la epidemiología y control de la Verticilosis del olivo. Mercacei Magazine 56:206-208.
- Bejarano-Alcázar, J., Blanco-López, M.A., Melero-Vara, J.M., Jiménez-Díaz, R.M. 1996. Etiology, importance, and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. Plant Disease 80:1233-1238.
- Bellahcene, M., Fortas, Z., Geiger, J.P., Matallah, A., Henni, D. 2000. *Verticillium* wilt in olive in Algeria: Geographical distribution and extent of the disease. Olivae 82:41-43.
- Benazoun, A. 1992. Contribution to the biological study of the olive bark borer, *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.) (Col., Scolytidae) in olive trees in the Taroudant region of Morocco. Olivae 40:26-36.

- Benson, D.M., Ashworth, L.J. 1976. Survival of *Verticillium albo-atrum* on non-suscept roots and residues in field soil. *Phytopathology* 66:883-887.
- Betram, J.G. 1929. De iepenziekte en de Iepenspintkevers [Elm disease and elm beetles]. Verslagen en Mededeelingen van den Plantenziektenkundigen Dienst te Wageningen nr. Tijdschridft over Plantenziekten 36:273-289.
- Birem, F. 2009. Evaluación de la resistencia de variedades de olivo al patotipo defoliante de *verticillium dahliae* y de las alteraciones fisiológicas en plantas infectadas. Tesis de Fin de Máster Olivicultura y Elaiotecnia, Universidad de Córdoba, España, 141 pp.
- Bishop, C.D., Cooper, R.M. 1983. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases. I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiological Plant Pathology* 23:323-343.
- Bissett, J., Borkent, A. 1988. Ambrosia galls: the significance of fungal nutrition in the evolution of the Cecidomyiidae (Diptera). En "Coevolution of fungi with plants and animals", (Pirozynski, K.A., Hawksworth, D.L. eds.) Academic Press, Toronto, pp. 203-225.
- Blanco-López, M.A., Bejarano-Alcázar, J., Melero-Vara, J.M., Jiménez-Díaz, R.M. 1989. Current status of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. Pathogen variation and population in soil. En: *Vascular wilt diseases of plants vascular wilt diseases of plants basic studies and control*, (Tjamos, E.C., Beckman, C.H. eds.), New York, Springer-Verlag, 590 pp.
- Blanco-López, M.A., Jiménez-Díaz, R.M. 1995. Una propuesta de lucha integrada contra la Verticilosis del olivo. *Fruticultura Profesional* 70:52-57.
- Blanco-López, M.A., Jiménez-Díaz, R.M., Caballero, J.M.. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucia. *Phytopathologia Mediterranea* 23:1-8.

- Blanco-López, M.A., López-Escudero, F.J. 2005. Resistencia y susceptibilidad a las Verticilosis. En: Libro segundo variabilidad y selección, (Tous, J., Del Río, C., Caballero, J.M., Rallo, L. eds.). En: Variedades de olivo en España, (Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., Del Río, C., Martín, A., Tous, J., Trujillo, I. eds.). Coedición Junta de Andalucía, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Grupo Mundi-Prensa, España, pp. 331-337.
- Blanco-López, M.A, Rodríguez-Jurado, D., Jiménez-Díaz, R.M. 1990. Incidence and seasonal variation of *Verticillium* wilt in olive orchards. 5th International *Verticillium* symposium, Leningrad. USSR, pp. 5.
- Blando, S., Mineo, G. 2006. On life-cycle of *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera Tephritidae) on fruits of *Olea europaea* var. *sylvestris* Brot. during spring time in Sicily. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura* 38:173-178.
- B.O.J.A. 2005. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía <http://www.juntadeandalucia.es/boja/2005/121/1>
- Bonello, P., Gordon, T.R., Storer, A.J. 2001. Systemic induced resistance in Monterey pine. *Forest Pathology* 31:99-106.
- Borkent, A., Bissett, J. 1985. Gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) are vectors for their fungal symbionts. *Symbiosis* 1:185-194.
- Born, G.L. 1974. Root infection of woody host with *Verticillium albo-atrum*. *Bulletin Illinois Natural History Survey* 31:209-249.
- Borror, D.J., De Long, D.M., Triplehorn, C.A. 1976. An introduction to the study of insects. Holt, Rinehart and Winston, New York. U.S.A., 852 pp.
- Brock, T.D. 1974. Biology of microorganisms, (2º eds.), Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ, 852 pp.

- Bronner, R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. En: Biology of insect-induced galls (Shorthouse, J.D., Rohfritsch, O. eds.), Oxford University Press, New York, USA., pp. 118-140.
- Busch, L.V., Smith, E.A., Njoh-Elango, F. 1978. The effect of weeds on the value of rotation as a practical control for *Verticillium* wilt of potato. Canadian Plant Disease Survey 58:61-64.
- Caballero, J.A. 2001. Control de plagas y enfermedades de olivares ecológicos en la comarca de los Pedroches. En: La práctica de la agricultura y ganadería ecológicas, (Comité Andaluz de Agricultura Ecológica eds.), pp. 259-265.
- Caballero, J.M., Del Rio, C. 2008. The olive world germplasm bank of Spain. Acta Horticulturae 791:31-38.
- Caballero, J.M., Pérez-Hernández, J., Blanco-López, M.A., Jiménez-Díaz, R.M. 1980. Olive, a new host of *Verticillium dahliae* in Spain. 5th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Patras, Greece, 50 pp.
- Campos, M., Peña, A. 1995. Response of *Phloeotribus scarabaeoides* (Col., Scolytidae) to ethylene in an olfactometer. Experientia 51:77-79.
- Cappello, A., Cartabellotta, D., Girgenti, P., Caleca, V., Drago, A. 2008. Il controllo fitosanitario dell'olivo da mensa e da olio in Sicilia. Campo Artigrafiche, Alcamo, Castelvetro. http://www.agrinovazione.regione.sicilia.it/agricoltura_ambiente/difesa/all_egati/controllo_fitosanitario_olio_sicilia_2008.pdf
- Capuzzo, C., Firrao, G., Mazzon, L., Squartini, A., Girolami, V. 2005. Candidatus *Erwinia dacicola*, a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55:1641-1647.
- Cardé, R., Minks, A.K. 1995. Control of moths by mating disruption: successes and constraints. Annual Review of Entomology 40:559-585.

- Carles-Tolrá, M. 2002. Catálogo de los dípteros de España, Portugal y Andorra (Insecta). Monografías Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA), Zaragoza, pp.1-323.
- Carlos Alberte. 2006. El barrenillo del olivo. Proyecto MOABEPE. Oliveira, pp. 1-2.
- Carter, W. 1962. Insects in relation to plant disease. Interscience Publishers, New York, 705 pp.
- Cassar, S., Blackwell, M. 1996. Convergent origins of ambrosia fungi. *Mycologia* 88:596-601.
- Celetti, M.J., Johnson, H.W., Platt, H.W. 1990. A note on the incidence of soilborne fungi in six crops used in rotation with potatoes. *Phytoprotection* 71:97-100.
- Cherrett, J.M., Powell, R.J., Stradling, D.J. 1989. The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. En: *Insect-fungus interactions*, (Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. ed.), Academic Press, London, pp. 93-120.
- Cirulli, M. 1981. Attuali cognizioni sulla Verticilliosi dell'olivo. *Informatore Fitopatologico* 31:101-105.
- Cirulli, M., Montemurro, G. 1976. A comparison of pathogenic isolates of *Verticillium dahliae* and sources of resistance in olive. *ACS-Agriculturae Conspectus Scientificus* 39:469-76.
- Civantos, M. 1999. Control de plagas y enfermedades del olivar. Colección: manuales prácticos, Consejo Oleícola Internacional (COI), Madrid, 207 pp.
- Civantos, M., Jiménez, A. 1994. La lucha contra la mosca del olivo en Jaén. *Agricultura*, pp. 57-61.
- Civantos, M., Sánchez, M. 1993. Control integrado en el olivar español y su influencia en la calidad. *Agricultura*, pp. 854-858.

- Coutin, R., Faivre-Amiot, A. 1981. Interrelations écologiques et symbiotiques complexes entre insectes et végétaux, *Lasioptera donacis* n. sp. (Diptera: Cécidomyiidae) et *Arundo donax* L. 106e Congrès National des Sociétés Savantes, Perpignan, France. Sciences Fasc, pp. 195-201.
- Coutin, R., Katlabi, H. 1986. Cecidomyiidae. En: Entomologie oleicole, (Arambourg, J. eds.), Consejo Oleícola Internacional (COI), Madrid, pp. 95-113.
- Crovetti, A. 1996. 'Plant protection: development of methodologies and the protection of production and the environment'. En: World olive encyclopaedia, (Civantos Lopez-Villalta, L. eds.), Barcelona: International Olive Oil Council, Madrid, pp. 225-250.
- Datnoff, L., Rodrigues, F., Seebold, K. 2007. Silicon and plant disease. En: Mineral nutrition and plant disease, (Datnoff, L.E., Elmer, W.H., Huber, D. eds.), American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 233-246.
- De Andrés-Cantero, F. 2001. Enfermedades y plagas del olivo. Riquelme y Vargas (4º eds.) SL, Jaén, 646 pp.
- De Laurentiis, G. 1993. Attacchi di *Prolasioptera berlesiana* sulle olive in abruzzo. Informatore Agrario 49:49-50.
- Delrio, G. 1979. Production losses and oil deterioration due to olive fly infestation in N.W. Sardinia. Organisation Internationale de Lutte Biologique et Intégrée contre les Animaux et les Plantes Nuisibles, section Regionale Ouest Paléarctique (Bulletin OILB/SROP) 2:136-137.
- Delrio, G., Prota, R. 1976. Osservazioni eco-etologiche sul *Dacus oleae* (Gmelin) nella Sardegna nord-occidentale. Bollettino di zoologia agraria e di bachicoltura 13:49-118.
- Dervis, S., Mercado-Blanco, J., Erten L., Valverde-Corredor, A., Pérez-Artés, E. 2010. Verticillium wilt of olive in Turkey: a survey on disease importance, pathogen diversity and susceptibility of relevant olive cultivars. European Journal Plant Pathology 127:287-301.

- Dillon, R.J., Dillon, V.M. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology* 49:71-92.
- Doctors van Leeuwen, W.M. 1939. An ambrosia gall on *Symplocus fasciculata* Zoll. *Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg* 49:27-42.
- Doganlar, M., Sertkaya, E., Skuhřavá, M., 2011. Pest status of olive leaf gall midge *Dasineura oleae* (Angelini, 1831), description of *Lasioptera oleicola* Skuhřavá sp. new (Diptera: Cecidomyiidae) and effectiveness of parasitoids on their populations in Hatay Turkey. *Türkiye Entomoloji Derneđi ve Dergisinin* 35:265-284.
- Dominici, M., Pucci, C., Montanan, G.E. 1986. *Dacus oleae* (Gmel.) ovipositing in olive drupes (Diptera, Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 101:111-120.
- Dowd, P.F. 1992. Insect interactions with mycotoxin-producing fungi and their hosts. En: *Handbook of applied mycology. Mycotoxins in ecological systems*, (Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B., Arora, D.K. eds.), Marcel Dekker, New York, USA., pp. 137-155.
- Easton, G.D., Nagle, M.E., Bailey, D.L. 1969. A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation water. *Phytopathology* 59:1171-1172.
- Economopoulos, A.P., Haniotakis, G.E., Michelakis, S. 1982. Population studies on the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmelin) (Dipt.,: Tephritidae) in Western Crete. *Journal of Applied Entomology* 93:463-476.
- El-Hamalawi, Z.A. 2008. Acquisition, retention and dispersal of soilborne plant pathogenic fungi by fungus gnats and moth flies. *Annals of Applied Biology* 153:195-203.
- El-Zik, M.K. 1985. Integrated Control of *Verticillium* wilt of Cotton. *Plant Disease* 69:1025-1032.
- Estes, A.M. 2009. Life in a fly: the ecology and evolution of the olive fly endosymbiont en *Candidatus Erwinia dacicola*. PhD thesis, University of Arizona, 196 pp.

- Estes, A.M., Hearn, D.J., Bronstein, J.L., Pierson, E.A. 2009. The olive fly endosymbiont, '*Candidatus Erwinia dacicola*,' switches from an intracellular existence to an extracellular existence during host insect development. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7097-7106.
- Evans, G. 1971. Influence of weed hosts on ecology of *Verticillium dahliae* in newly cultivated areas of Namoy valley, New-SouthWales. *Annals of Applied Biology* 67:169-75.
- Evans, G, Snyder, WC, Wilhelm, S. 1966. Inoculum increase of the *Verticillium* wilt fungus in Cotton. *Phytopathology* 56:590-594.
- F.A.O. STAT. 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Fernández, M.M. 1997. Los Hylesininae (Coleóptera: Scolytidae) parásitos de los pinos en la provincia de León. *Boletín de la Asociación española de Entomología* 21:195-209.
- Fletcher, B.S., Pappas, S., Kapatós, E. 1978. Changes in the ovaries of olive flies *Dacus oleae* (Gmelin) during the summer, and their relationship to temperature, humidity and fruit availability. *Ecological entomology* 3:99-107.
- Fradin, E.F., Thomma, B.P.H.J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahlia* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7:71-86.
- Francke-Grosmann, H. 1967. Ectosymbiosis in wood-inhabiting beetles. En: *Symbiosis*, (Henry, S.M. eds.), Academic Press, New York, USA., pp. 141-05.
- Fransen, J.J. 1931a. Enkle gegevens omtrent de verspreiding van door *Graphium ulmi* Schwarz veroorzaakte iepenziekte door de Iepenspintkevers, *Eccoptogaster (Scolytus) scolytus* F. en *Eccoptogaster (Scolytus) multistriatus* Mrsh. In verband met de bestrijding dezer ziekte [Some data on the spread by cambium beetles, *Scolytus scolytus* and *Scolytus multistriatus*, of the elm disease due to *G. ulmi* in connection with the control of the disease]. *Tijdschrift over Plantenziekt* 37:29-63.

- Fransen, J.J. 1931b. Door welke oorzaak onstaade coremia van *Ceratostomella ulmi* in de poppenwiegen van de Iepenspintkevers [Why do the coremia of *Ceratostomella ulmi* occur in the pupal chambers of the elm bark beetles]. *Fungus* 7:39-42.
- Fransen, J.J. 1939. Elm disease, elm beetles and their control [Iepenziekte iepenspintkevers an beider bestrijding]. PhD Thesis. Agricultural University, Wageningen, 181 pp.
- Fransen, J.J., Buisman, C.J. 1935. Infectieproeven op verschillende iepensoorten met behulp van iepenspintkevers. *Tijdschrift over Plantenziekten* 43:195-223.
- Fraval, A. 1997. Olive fruit midge. www.inra.fr/internet/produits/HYPPZ
- Furniss, M.M., Woo, J.Y., Deyrup, M.A., Atkinson, T.H. 1987. Prothoracic mycangium on pine-infesting *Pityoborus* spp. (Coleoptera: Scolytidae). *Annals of the Entomological Society of America* 80:692-696.
- Gagné, R. 1989. The plant feeding gall midges of North America. Cornell University Press, Ithaca, Ithaca, New York, USA., 356 pp.
- Gagné, R.J. 2004. A catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. *Memoirs of the Entomological Society of Washington* 25:1-408.
- Gagné, R.J. 2010. Update for a catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. Digital version 1. USDA, Washington. http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12754100/Gagne2010World_Catalog_Cecidomyiidae.pdf. 20.V.2011
- Garber, R.H., Houston, B.R. 1966. Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in the cotton plant. *Phytopathology* 56:1121-1126.
- Garber, R.H., Presley, J.T. 1971. Relation of air temperature to development of *Verticillium* wilt on cotton in the field. *Phytopathology* 61:204-207.
- García-Cabello, S., Pérez-Rodríguez, M., Blanco-López, M.A., López-Escudero, F.J. 2012. Distribution of *Verticillium dahliae* through watering systems in widely irrigated olive

- growing areas in Andalucía (southern Spain). *European Journal of Plant Pathology* 133:877-885.
- García-Ruiz, G. 2011. Evaluación de la resistencia de variedades de olivo españolas a *Verticillium dahliae*, en condiciones de invernadero. Tesis de Fin de Máster de Producción y Protección y Mejora Vegetal, Universidad de Córdoba, España, 34 pp.
- Gebhardt, H., Weiss, M., Oberwinkler, F., 2005. *Dryadomyces amasae*: a nutritional fungus associated with ambrosia beetles of the genus *Amasa* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Mycological Research* 109:687-696.
- Gil, P.Z.N., Bustillo, P.A.E., Gomez, D.E., Marin, M.P. 2004. *Corthylus* n. sp. (Coleoptera: Scolytidae), plaga del aliso en la Cuenca de Río Blanco en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 30:171-178.
- Goicoechea, N. 2009. To what extent are soil amendments useful to control *Verticillium* wilt?. *Pest Management Science* 65:831-839.
- González, N., Trapero-Casas, A. 2006. El Escudete de la aceituna II: Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica del agente causal. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 32:723-737.
- González, N., Vargas-Osuna, E., Trapero-Casas, A. 2006. El Escudete de la aceituna I: Biología y daños en olivares de la provincia de Sevilla. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 32:709-722.
- González, R. 1990. Estudio bioecológico de *Phloeotribus scarabaeoides* Bernard, 1978 (Coleoptera, Scolytidae) en la provincia de Granada. Tesis Doctoral, Departamento de Biología, Universidad de Granada, España, 450 pp.
- González, R., Campos, M. 1990. Evaluation of natural enemies of *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.) (Col: Scolytidae) in Granada olive groves. *Acta Horticulturae (ISHS)* 286:355-358.

- González, R., Campos, M. 1991. Relationship between the phenology of *Phloeotribus scarabaeoides* (Col., Scolytidae) and his parasitoids (Hym., Pteromalidae). Boletín de la Asociación española de Entomología 15:131-143.
- González, R., Campos, M. 1994. A preliminary study of the effect of attacks by *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.) (Col., Scolytidae) on the productivity of the olive tree *Olea europea* L.. Bulletin de la Société Entomologique Suisse 67:67-75.
- González, R., Campos, M. 1995. A preliminary study on the use of trap-trees baited with ethylene for the integrated management of the olive beetle, *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.) (Col., Scolytidae). Journal of Applied Entomology 119:601-605.
- González, R., Campos, M. 1996. The influence of ethylene on primary attaction of the olive beetle, *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.) (Col., Scolytidae). Experientia 52:723-726.
- Gordon, T.L., Storer, A.J., Wood, D.L. 2001. The pitch canker epidemic in California. Plant Diseases 85:1128-1139.
- Hagen, K.S. 1966. Dependence of the olive fly *Dacus oleae* larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. Nature 209:423-424.
- Harpaz, I., Gerson, U. 1966. The biocomplex of the olive fruit fly *Dacus oleae* (Gmelin), the olive fruit midge *Prolasioptera berlesiana*, and the fungus *Macrophoma dalmatica*. Berl. y Vogl. in olive fruits in the Mediterranean Basin. Scripta hierosolymitana 18:81-126.
- Harrington, T.C. 1993. Biology and taxonomy of fungi associated with bark beetles. En: Beetle-pathogen interactions in conifer forests, (Schowalter, R.D., Filip, G.M. eds.). Academic Press. San Diego, California, pp. 38-58.
- Heale, J.B. 1988. *Verticillium* spp. the cause of vascular wilts in many species. Advances in Plant Pathology 6:291-312.

- Heath, J.J., Stireman, J.O. 2010. Dissecting the association between a gall midge, *Asteromyia carbonifera*, and its symbiotic fungus, *Botryosphaeria dothidea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 137:36-49.
- Hepdurgun, B. 1998. Zeytin kizilkurdu [*Lasioptera berlesiana* Paoli (Diptera: Cecidomyiidae)]'nın Tanınması, izmir ilindeki yayılışı, biyolojisi ve doğal düşmanları üzerinde araştırmalar. ege üniversitesi fen bilimleri enstitüsü. Yüksek Lisans-Doktora Tezi, 105 pp.
- Hepdurgun, B., Onder, F. 1999. Investigations on the biology of the olive gall midges (*Lasioptera berlesiana* (Paoli) (Diptera: Cecidomyiidae). *Türkiye Entomoloji Dergisi* 23:191-202.
- Hepdurgun, B., Onder, F. 2000. *Lasioptera berlesiana* (Paoli) (Dipt.: Cecidomyiidae) (Zeytin kizilkurdu)'nın tanınması ve yayılımı üzerinde araştırmalar (Studies on the morphology and distribution of the olive fruit midge *Lasioptera berlesiana* (Paoli) (Dipt.: Cecidomyiidae). *Türkiye Entomoloji Dergisi* 24:133-142.
- Hiemstra, J.A. 1998. Some general features of *Verticillium* wilts in trees. En: *Compendium of Verticillium wilt in trees species*, (Hiemstra, J., Harris, D. eds.), CPRO-DLO, Wageningen, The Netherlands/HRI-East Malling, pp. 5-11.
- Hiemstra, J.A., Harris, D.C. 1998. A compendium of *Verticillium* wilts in tree species. CPRO-DLO/HRI, Ponsen and Looijen, Wageningen/West-Malling, The Netherlands, 80 pp.
- Hinds, T.E. 1972. Insect transmission of *Ceratocystis* species associated with aspen cankers. *Phytopathology*, 62:221-225.
- Holmes, F. W., Tsai, J. H. 1980. Vectors of plant pathogens. (Harris, K.F., Maramorosch, K. eds), 467 pp.
- Hsiau, P.T.W., Harrington, T.C. 2003. Phylogenetics and adaptations of basidiomycetous fungi fed upon by bark beetles (Coleoptera: Scolytidae). *Symbiosis* 34:111-131.

- Huang, H.C. 2003. Verticillium wilt of alfalfa: epidemiology and control strategies. Canadian Journal of Plant Pathology 25:328-338.
- Huber, D.M., Thompson, I.A. 2007. Nitrogen and plant disease. En: Mineral nutrition and plant disease, (Datnoff, L.E., Wade, H.E., Huber, D.M. eds.), APS, St. Paul, MN, 278 pp.
- Hulcr, J., Kolarik, M., Kirkendall, L.R. 2007. A new record of fungus-beetle symbiosis in *Scolytodes* bark beetle s (Scolytidae, Curculionidae, Coleoptera). Symbiosis 43:151-159.
- Humanes, J., Civantos, M. 1992. Producción de aceite de oliva de calidad. Influencia del cultivo. Junta de Andalucía, pp. 21-101.
- Iannotta, N., Belfiore, T., Noce, M.E., Scalercio, S., Vizzarri, V. 2008. Correlation between *Bactrocera oleae* infestation and *Camarosporium dalmaticum* infection in an olive area of southern Italy. Acta Horticulturae (ISHS) 949:309-316.
- Iannotta, N., Macchione, B., Noce, M.E., Perri, E., Scalercio, S. 2006. Susceptibility of olive genotypes to *Bactrocera oleae* (Gmelin) attacks [*Olea europaea* L.]. Italus Hortus 13:242-245.
- Iannotta, N., Nocea, M.E., Ripaa, V., Scalercioa, S., Vizzarria, V. 2007. Assessment of susceptibility of olive cultivars to the *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) and *Camarosporium dalmaticum* (Thüm.) Zachos y Tzav.-Klon. attacks in Calabria (Southern Italy). Journal of Environmental Science and Health 42:789-793.
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Trouillas, F.P., Michailides, T.J. 2010. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. Mycologia 102:1350-1368.
- I.N.R.A. (fr.). 2003. Institut National De Recherche Agronomique, Olive fruit fly.
<http://www.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/6dacole.htm> 2008

- Ishikawa, H. 1989. Biochemical and molecular aspects of endosymbiosis in insects. *International Review of Cytology* 116:1-45.
- Iton, E.F. 1960. Studies on a wilt disease of cacao at River Estate. II. Some aspects of wind transmission. En: *Annual Report on Cacao Research, 1959-1960.*, (St Augustine, Trinidad eds.), Imperial College of Tropical Agriculture, University of the West Indies, pp. 47-58.
- Iton, E.F. 1966. Ceratocystis wilt. En: *Annual report on cacao research, 1965.* (St. Augustine, Trinidad eds.), Imperial College of Tropical Agriculture, University of the West Indies, pp. 44-56.
- Janson, E.M., Grebenok, R.J., Behmer, S.T., Abbot, P. 2009. Same host-plant, different sterols: variation in sterol metabolism in an insect herbivore community. *Journal of Chemical Ecology* 35:1309-1319.
- Janson, E.M., Stireman, J.O., Singer, M.S., Abbot, P. 2008. Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. *Evolution* 62:997-1012.
- Jiménez-Díaz, R.M., Cirulli, M., Bubici, G., Jimenez-Gasco, M.M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C. 2012. Verticillium Wilt: A major threat to olive production. Current status and future prospects for its management. *Plant Disease* 96:304-329.
- Jones, K.G., Blackwell, M. 1998. Phylogenetic analysis of ambrosial species in the genus *Raffaelea* based on 18S rDNA sequences. *Mycological Research* 102:661-665.
- Kajimura, H., Hijii, N. 1992. Dynamics of the fungal symbionts in the gallery system and the mycangia of the ambrosia beetle, *Xylosandrus mutilatus* (Blandford) (Coleoptera: Scolytidae) in relation to its life history. *Ecological Research* 7:107-117.
- Katan, J. 1987. Soil solarization. En: *Innovative approaches to plant disease management*, (Chet, I. ed.), Wiley, New York, pp. 77-105.

- Katsoyannos, P. 1992. Olive pests and their control in the Near East. En: Plant Production and Protection, (FAO) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 187 pp.
- Kehr, V., Kost, G. 1999. Microhabitat planzengallen. das zusammenleben von gallmücken und pilzen. Biologie in Unserer Zeit 29:18-25.
- Kohnle, U., Densborn, S., Duhme, D., Vite, J.P. 1992. Bark beetle attack on host logs reduced by spraying with repellents. Journal of Applied Entomology 114:83-90.
- Kile, G.A. 1993. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara*. En: *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. Taxonomy, ecology and pathogenicity, (Wingfield, M.J., Seifert, K.A., Webber, J.F. eds.), American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA., pp. 173-183.
- Kirisits, T., 2004. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. En: Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis, (Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.C., Evans, H.F. eds). Kluwer Academic Press, Netherlands, pp. 181-235.
- Kirst, G.O., Rapp, H. 1974. Zur physiologie der galle von *Mikiola fagi* Htg. auf blättern von *Fagus sylvatica* L.: Transport 14C-markierter assimilate aus dem befallenen blatt und aus nachbarblättern in die galle. Biochemistry and Physiology Pflanzen 165:445-456.
- Klosterman, S.J., Atallah, Z.K., Vallad, G.E., Subbarao, K.V. 2009. Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* species. Annual Review of Phytopathology 47:39-62.
- Kounatidis, I., Crotti, E., Sapountzis, P., Sacchi, L., Rizzi, A., Chouaia, B., Bandi, C., Alma, A., Daffonchio, D., Mavragani-Tsipidou, P., Bourtzis K. 2009. *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*). Applied and Environmental Microbiology 75:3281-3288.
- Krikun, J., Bernier, C.C. 1990. Morphology of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in roots of gramineous plants. Canadian Journal of Plant Pathology 12:439-441.

- Krokene, R., Solheim, H. 1998. Pathogenicity of four blue-stain fungi associated with aggressive and nonaggressive bark beetles. Norwegian Forest Research Institute, American Phytopathological Society, Phytopathology 88:39-44.
- Kukor, J.J., Martin, M.M. 1983. Acquisition of digestive enzymes by siricid woodwasps from their symbiont. Science 220:1161-1163.
- Label, T., Peele, C., Veenstra, A. 2012. Fungi associated with *Asphondylia* (Diptera: Cecidomyiidae) galls in *Sarcocornia quinqueflora* and *Tecticorniae arbuscula* (Chenopodiaceae). Fungal diversity 55:143-154.
- La Greca, L., Vrenna, G. 1995. Damages by *Sphaeropsis dalmatica* in Calabria (South Italy) [*Olea europaea*]. Informatore Fitopatologico 45:32-33.
- Lazarovits, G., Tenuta, M., Conn, K.L. 2000. Utilization of high nitrogen and swine mature amendments for control of soil-born disease: Efficacy and mode of action. Acta Horticulturae (ISHS) 532:59-64.
- Lazzizzera, C., Frisullo, S., Alves, A., Phillips, A.J.L., 2008. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. Plant Pathology 57:948-956.
- León-Gallego, M. 2000. Etiología e importancia de la "seca" del olivar en la comarca de la sierra de Cádiz. Trabajo Profesional Fin de de Carrera, Universidad de Córdoba, 114 pp.
- Levin, A.G., Lavee, S., Tsrur, (Lahkim) L. 2003a. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. Plant Pathology 52:212-218.
- Levin, A.G., Lavee S., Tsrur (Lahkim) L. 2003b. Epidemiology and effects of *Verticillium* wilt on yield of olive trees (cvs. Barnea and Souri) irrigated with saline water in Israel. Phytoparasitica 31:333-343.

- Levin, A.G., Lavee, S., Tsrur (Lahkim), L. 2007. The influence of salinity on *Verticillium dahliae* in stem cuttings of five olive cultivars. *Journal Phytopathology* 155:587-592.
- Levy, J., Isaac, I. 1976. Colonization of host tissue of varying resistance to *Verticillium dahliae*. *Transactions of the British Mycological Society* 67:91-94.
- Ligoxigakis, E.K., Vakalounakis, D.J., Thanassouloupoulos, C.C. 2002. Weed hosts of *Verticillium dahliae* in Crete: susceptibility, symptomatology and significance. *Phytoparasitica* 30:511-518.
- Longo, O., Cavallo, C., D'Agnano, G., Schiavone, D., Porcelli, E. 2004. Inusuale cascola di olive per azione combinata di tre parassiti. *Informatore Agrario* 22:57-59.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. 1996. Evaluación de la eficacia fungicida en el control de la Verticilosis del olivo. VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología, Córdoba, 197 pp.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. 1999. First report of transmission of *Verticillium dahliae* by infested manure in olive orchards in Andalucía (Southern Spain). *Plant Disease* 83:1178.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. 2001. Effect of a single or double solarization to control verticillium wilt in established olive orchards in Spain. *Plant disease* 85:489-496.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. 2005a. Recovery of young olive trees from *Verticillium dahliae*. *European Journal Plant Pathology* 113:367-375.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. 2005b. Effects of drip irrigation on population of *Verticillium dahliae* in olive orchards. *Journal of Phytopathology* 153:238-239.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. 2005c. Isolation and morphologic characterization of microsclerotia of *Verticillium dahliae* isolate from Soil. *Biotechnology* 4:296-304

- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. 2007. Relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of Verticillium wilt of olive. *Plant Disease* 91:1372-1378.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A., Del Río, C., Caballero Reig, J.M. 2007. Response of olive cultivars to stem puncture inoculation with a defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *HortScience* 42:294-298.
- López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A., Trapero-Casas, A. 2008. Influencia de las cubiertas vegetales en las enfermedades del olivar. En: Cubiertas vegetales en olivar, (Rodríguez-Lizana, A., Ordóñez-Frenández, R., Gil-Ribes, J. eds.) Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, pp. 1001-1114.
- Lopez-Escudero, F.J., Del Rio, C., Caballero, J.M., Blanco-López, M.A. 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 110:79-85.
- López-Escudero, F.J., Martos-Moreno, C., Blanco-López, M.A. 2003. Análisis y significado epidemiológico de la población de *Verticillium dahliae* en el suelo. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, 60 pp.
- López-Escudero, F.J., Mercado-Blanco, J. 2011. Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344:1-50.
- López-Escudero, F.J., Mercado-Blanco, J., Roca, J.M., Valverde-Corredor, A., Blanco-López, M.A. 2010. Verticillium wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): relation with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Phytopathologia Mediterranea* 49:370-380.
- López-Escudero, F.J., Roca, L.F., Trapero-Casas, A., Blanco-López, M.A. 2009. An outbreak of Verticillium wilt in hedgerow olive orchards in Andalucía (Southern Spain). 4th European Meeting of the IOBC Working Group Integrated Protection of Olive Crops, Córdoba, Spain, 101 pp.

- López-Escudero, F.J., Roca, J.M., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J. 2012. Correlation between virulence and morphological characteristics of microsclerotia of *Verticillium dahliae* isolates infecting olive. *Journal of Phytopathology* 160:431-433.
- Mamaev, B.M. 1975. Evolution of gall forming insects-gall midges. British Library, Lending Division, Boston Spa, Wetherby, UK., 317 pp.
- Manousis, T., Ellar, D.J. 1988. *Dacus oleae* microbial symbionts. *Microbial Science* 5:149-152.
- Marchal, E. 1927. Rapport sur les résultats des recherches effectuées à la station de phytopatologie de l'état à gembloux sur la maladie l'orme. *Bulletin de la Societe Centre Forestière de Belgique* 35:162-164.
- Martos-Moreno, C. 2003. Resistencia de variedades de olivo al aislado defoliante de *Verticillium dahliae* Kleb. y reducción de la enfermedad por la infección previa con el aislado defoliante., Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 243 pp.
- Martos-Moreno, C., López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. 2006. Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *HortScience* 41:1313-1316.
- Mateo-Sagasta, E. 1968. Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum*. Alm. (Deuteromicete :melanconial). *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola* 30:31-135.
- Mateo-Sagasta, E. 1975. Plagas y enfermedades. Ponencia de enfermedades. II Seminario Oleícola Internacional. Cordoba, España, 272 pp.
- Mathre, D. 1986. Occurrence of *Verticillium dahliae* in barley. *Plant Disease* 70:981.
- Mathre, D. 1989. Pathogenicity of an isolate of *Verticillium dahliae* from barley. *Plant Disease* 73:164-167.

- Mazomenos, B.E., Kondilis, P., Hadjoudis, E., Moustakali, I., Tsoucaris, G. 1989. Cyclodextrins as dispensing system for *Dacus oleae* pheromone. 16th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Chicago, pp. 239-240.
- Mazomenos, B.E., Stefanou, D., Langley, P., Pantazi-Mazomenos, A. 1997. Effects of sugarformulated triflumuron treated targets on reproduction in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Bulletin of Entomological Research 87:169-172.
- Mazzini, M., Vita, G. 1981. Identificazione submicroscopica del meccanismo di trasmissione del batterio simbiote in *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). Redia 64:277-301.
- McKeen, C.D., Thorpe, H. 1973. Pathogenic species of *Verticillium* in horticultural crops and weeds in southwestern Ontario. Canadian Journal of Plant Pathology 53:615-622.
- Melis, A. 1962. The protection of the olive tree at the present time. Redia 47:1-79.
- Mercado-Blanco, J., López-Escudero, F.J. 2012. *Verticillium* wilt of olive and its control: the heat is on. Plant Soil 355:1-5.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Parrilla-Araujo, S., Jiménez-Díaz, R.M. 2003. Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. Plant Disease 87:1487-1494.
- Meyer, J. 1987. Plant galls and gall inducers. Gebrüder Borntraeger. Berlin, Stuttgart, 291 pp.
- Michelakis, S.E., 1990. The olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmelin) in Crete, Greece. Acta Horticulturae 286:371-374.
- Michelakis, S.E., Neuenschwander, P. 1983. Estimate of crop losses caused by *Dacus oleae* (Gmelin) in Crete, Greece. En: Fruit flies of economic importance, (Cavalloro, R. eds.), pp. 603-611.

- Mol, L., Termorshuizen, A.J. 1995. Life cycle and ecology of *Verticillium dahliae* in potato. En: second international potato modeling conference. Potato ecology and modeling of crops under conditions limiting growth, (Haverkort, A. J., MacKerron, D.K.L. eds.), Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 251-263.
- Moller, W.J., DeVay, J.E. 1968. Insect transmission of *Ceratocystis fimbriata* in deciduous fruit orchards. *Phytopathology* 58:1499-1508.
- Montiel-Bueno, A., Madueño, C. 1995a. Determinación del umbral de tratamiento para la mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) en olivar destinado a la producción de aceite. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 21:577-588.
- Montiel-Bueno, A., Madueño, C. 1995b. Cálculo práctico del umbral de tratamiento para la mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) en olivar de producción de aceite en Jaén. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 21:589-596.
- Montiel-Bueno, A., Morkno, R. 1982. Metodología utilizada en España para la realización de estudios bioecológicos sobre las poblaciones naturales del *Dacus oleae* (Gmelin). Resultados provisionales obtenidos en dos años de trabajo. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 8:43-53.
- Montiel- Bueno, A., Simón Mata, M. A. 1985. La interrupción de la comunicación sexual de la mosca del olivo *Dacus oleae* (Gmelin) como estrategia de lucha integrada en olivar. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 11:11-23.
- Moral, J., Muñoz-Díez, C., González, N., Trapero-Casas, A., Michailides, T.J. 2010. Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species collected from olive and other hosts in Spain and California. *Phytopathology* 100:1340-1351.
- Morschel, J.R. 1961. Recorded plant diseases in and outside Australia. Part 2 - Fruit and edible nut crops. Commonwealth Department of Health Division of Plant Quarantine, Canberra, 113 pp.

- Morse, A., Blanchette, R., 2002. Etiology of red stain in boxelder. Department of plant pathology. University of Minnesota, St. Paul, Plant Management Network.
<http://forestpathology.cfans.umn.edu/pdf/morse.pdf>
- Mueller, U.G., Schultz, T.R., Currie, C.R., Adams, R.M.M., Malloch, D. 2001. The origin of attine ant-fungus mutualism. *Quarterly Review of Biology* 76:169-197.
- Narayanan, E.S., Chawla, S.S. 1962. Parasites of fruit fly pests of the world. *Beitrage zur Entomologie* 12:437-476.
- Neger, F.W. 1908. Ambrosiapilze. *Berichte der Deutsche Botanische Gesellschaft* 26:735-754.
- Neger, F.W., 1910. Ambrosiapilze III. Weitere beobachtungen an Ambrosiagallen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 28:455-480.
- Neuenschwander, P., Bigler, F., Delucchi, V., Michelakis, S. 1983. Natural enemies of preimaginal stages of in western crete. I. Bionomics and phonologies. *Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria "Filippo Silvestri"* 40:3-32.
- Neuenschwander, P., Michelakis, S., Holloway, P., Berchtol, W. 1985. Factors affecting the susceptibility of fruits of different olive varieties to attack by *Dacus oleae* (Gmelin) (Dipt., Tephritidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 100:174–188.
- Ortiz, A., Quesada, A., Nogueras, M. 1999. Hacia el control integral de una plaga del olivar en la provincia de Jaén: *Euzophera pinguis* Haw. Instituto de Estudios Giennenses Ediciones. Jaén, 114 pp.
- Paine, T.D., Raffa, K.F., Harrington, T.C. 1997. Interactions among Scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology* 42:179-206.
- Paoli, G. 1907. *Lasioptera berlesiana* n. sp. *Redia* 4:45-47.

- Papazolomontos, A. 1969. Annual Report of the Department of Agriculture, Ciprus, for the year 1968. 107 pp.
- Pegg, G.F. 1974. The impact of *Verticillium* diseases in agriculture. *Phytopathologia Mediterranea* 23:176-192.
- Pegg, G.F., Brady, B.L., 2002. *Verticillium* wilts. CABI Publishing, Oxford, UK, 539 pp.
- Petri, L. 1910. Untersuchung uber die darmbakterien der olivenfliege. *Zentbl Bakteriolog P* 26:357-367.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Correia, A., Luque, J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella anamorphs*. *Mycologia* 97:513-529.
- Phillipsen, W.J., Ascern, M.E., Landwehr, V.R. 1986. Colonization, emergence and survival of *Hylurgopinus rufipes* and *Scolytus multistriatus* (Coleoptera:Scolytidae) in insecticide-treated elm wood. *Journal of Economic Entomology* 79:1347-1350.
- Pearce, G.D., Gibbs, J.N. 1981. *Verticillium* wilt of trees and shrubs. Arboricultural leaflet 9. Dept. of the Environment, Forestry Commission, H.M. Stationery Office (HMSO), London, 8 pp.
- Poinar, G.O., Hess, R.T., Tsitsipis, J.A. 1975. Ultrastructure of the bacterial symbiotes in the pharyngeal diverticulum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Trypetidae; Diptera). *Acta Zoologica* 1:77-84.
- Popushoi, I.S., Kulik, M.F. 1976. Dieback of apricot. *Zashch Rast*, pp. 46-47.
- Powelson, M., Johnson, K., Rowe, R. 1993. Management of diseases caused by soilborne pathogens. En: *Health management Potato*, (Rowe, R. eds.), American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp.149-158.
- Pucci, C., Ambrosi, G. 1981. Ovideposizione del *Dacus oleae* (Gmelin) e dimensioni delle drupe. *Frustula Entomologica (N.S.)* 4:181-194.

- Pucci, C., Montanari, G.E., Bagnoli, B. 1985. Influence of some climatic factors on mortality of eggs and larvae of *Dacus oleae* (Gmelin). CEC/FAO/IOBC International Joint Meeting on Integrated Pest Control in Olive-Groves, 3-6 April 1984, Pisa, Italy, pp. 78-83.
- Purcell, A.H., Almeida, R.P.P. 2005. Insects as vectors of disease agents. En: Encyclopedia of plant and crop science, (Goodman, R.M. eds.), Marcel Dekker, New York, USA, pp. 1-5.
- Quinlan, R.J., Cherrett, J.M. 1978. Studies on the role the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecological Entomology* 2:161-170.
- Raya-Ortega, M.C. 2005. Resistencia en olivo a *Phytophthora* spp. y *Verticillium dahliae*. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba. 394 pp.
- Rice, R. 2000. Bionomics of the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) olea*. *University of California, Plant Protection Quarterly* 10:1-5.
- Rice, R.E., Phillips, P.A., Stewart-Leslie, J., Sibbert, G.S. 2003. Olive fruit fly populations measured in central and southern California. *California Agriculture* 57:122-127.
- Rizzo, R., Caleca, V. 2006. Resistance to the attack of *Bactrocera oleae* (Gmelin) of some Sicilian olive cultivars. *Olivebioteq*, Mazara del Vallo, Marsala, Italy, pp. 5-10.
- Rodríguez-Jurado, D. 1993. Interacciones huesped-parasito en la marchitez del olivo (*Olea europaea* L.) inducida por *Verticillium dahliae* Kleb. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, Spain, 324 pp.
- Rodríguez-Jurado, D., Bejarano-Alcázar, J. 2007. Dispersión de *Verticillium dahliae* en el agua utilizada para riego de olivares en Andalucía. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 33:547-562.

- Rodríguez-Navarro, E. 2006. Estudio epidemiológico de la Verticilosis del olivo (*Verticillium dahliae*, Klebahn 1913) en la provincia de Granada. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 240 pp.
- Rohfritsch, O. 1992a. Fungus associated gall midge, *Lasioptera arundinis* (Shiner), on *Phragmites australis* (Cav.). Trin. Bulletin de la Societe Botanique de France, Lettres Botaniques 139:45-59.
- Rohfritsch, O. 1992b. Patterns in gall development. En: Biology of Insect-Induced Galls, (Shorthouse, J.D., Rohfritsch, O. eds.), Oxford University Press, New York, USA, pp. 60-86.
- Rohfritsch, O. 1997. Morphological and behavioral adaptations of the gall midge *Lasioptera arundinis* (Shiner) (Diptera: Cecidomyiidae) to collect and transport conidia of its fungal symbiont. Tijdschrift voor Entomologie 140:59-66.
- Rohfritsch, O., 2008. Plants, gall midges, and fungi: a three-component system. Entomologia Experimentalis et Applicata 128:208-216.
- Rohfritsch, O., Shorthouse, J.D. 1982. Insect galls. En: Molecular biology of plant tumors, (Kahl, G., Schell, J. eds.), Academic Press, New York, USA, pp. 131-152.
- Rojas, M.G., Morales-Ramos J.A., Harrington, T. 1999. Association between the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) and *Fusarium solani* (Moniliales: Tuberculariaceae). Annals of the Entomological Society of America 92:98-100.
- Roskam, J.C. 1992. Evolution of the gall-inducing guild. Biology of insect-induced galls, (Shorthouse, J.D., Rohfritsch, O. eds.), Oxford University Press, New York, USA, pp. 34-49.
- Roskam, J.C. 2005. Phylogeny of gall midges (Cecidomyiidae). Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods, (Raman, A., Schaefer, C.W., Withers, T.M. eds.), Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp. 305-319.

- Ruggieri, G. 1946. A new disease of olive. Italian Agricola, 83:369-372.
- Ruggieri, G. 1948. Ricerche ed esperienze su una tracheovorticilliosi dell'olivo. Olivicoltura 3:6-9.
- Ruiz Torres, M.J. 2010. Aumentan los ataques de polilla del olivo en Andalucía. Vida rural 316:46-51.
- Russo, G. 1938a. Contributo alla conoscenza dei coleoteri scolitidi, fleotribo: *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.). Fauv. Parte prima: Morfologia, anatomia e istologia. Bollettino del R. Laboratorio di Entomologia Agraria di Portici 1:1-260.
- Russo, G. 1938b. Contributo alla conoscenza dei coleoteri scolitidi, fleotribo: *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.). Fauv. Parte seconda: Biografia, simbionti, danni e lotta. Bollettino del R. Laboratorio di Entomologia Agraria di Portici 2:1-419.
- Sabariego-Sánchez, E.M. 2007. Evaluación de las poblaciones de *Bactrocera oleae* (Gmelin) y niveles de daños en distintas técnicas de cultivo. Trabajo Profesional de Fin de Carrera, Universidad de Córdoba, 83 pp.
- Saeedizadeh, A., Kheiri, A., Okhovat, M., Hoseininejad, A. 2003. Study on interaction between root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and wilt fungus *Verticillium dahliae* on olive seedlings in greenhouse. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 68:139-43.
- Saeedizadeh, A., Kheiri, A., Okhovat, S.M., Zad, J., Nehad, S.A.H. 2006. A study on the growth of one-year-old seedling of olive cv. Zard in the presence of two different soilborne pathogens, *Meloidogyne javanica* and *Verticillium dahliae*. Iranian Journal of Agricultural Sciences 37:793-800.
- Salgues, R. 1937. Affections parasitaires des olives et modification physico-chimiques de l'huile extraite. Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales (Paris) 124: 817-819.

- Sánchez-Alcalá, I. 2005. Evaluación de la eficacia de sustancias fungicidas para el control de la Verticilosis del olivo y de la podredumbre radicular del olivo. Trabajo Profesional Fin de Carrera, Universidad de Córdoba, España, 211 pp.
- Sánchez-Hernández, M.E., Muñoz García, M., Brasier C.M., Trapero-Casas, A. 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora taxa* associated with a new root disease of olive trees. Plant Disease 85:411-416.
- Sánchez-Hernández, M.E., Ruiz-Dávila, A., Pérez de Algaba, A., Blanco-López, M.A., Trapero-Casas, A. 1998a. Occurrence and aetiology of death of young olive trees in southern Spain. European Journal of Plant Pathology 104:347-357.
- Sánchez-Hernández, M.E., Ruiz-Dávila, A., Trapero-Casas, A. 1997. First report of *Phytophthora megasperma* and *Pythium irregulare* as olive tree root pathogens. Plant Disease 81:1216.
- Sánchez Hernández, M.E., Ruiz Dávila, A., Trapero-Casas, A. 1998b. La "seca" de olivos jóvenes II: Identificación y patogenicidad de los hongos asociados con podredumbres radiculares. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 24:581-602.
- Sasso, R., Viggiani, G. 2007. Preliminary notes on the gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) associated with the olive fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). Bulletin of International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB) y West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP) 30:43-46.
- Sauer, A.E., Karg, G. 1998. Variables affecting pheromone concentration in vineyards treated for mating disruption of grape vine moth. Journal of Chemical Ecology 24:289-302.
- Saydan, C., Copcu, M. 1972. Verticillium wilt of olives in Turkey. Journal of Turkish Phytopathology dergisi (Türkiye Fitopatoloji Derneği) 1: 45-49.

- Schnathorst, W.C. 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. En: Fungal wilt diseases of plants, (Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. eds.), Academic Press, New York, pp. 81-111.
- Schnathorst, W.C., Mathre, D.E. 1966a. Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. *Phytopathology* 56:1155-1161.
- Schnathorst, W.C., Mathre, D.E. 1966b. Cross-protection in cotton with strain of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 56:1204-1209.
- Schnathorst, W.C., Sibbett, G.S. 1971. The relations of strains of *Verticillium albo-atrum* to severity of *Verticillium* wilt in *Gossypium hirsutum* and *Olea europaea* in California. *Plant Disease Reporter* 55: 780-782.
- Schreiber, L.R., Green, R. J.J. 1963. Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by the soil fungistatic principle. *Phytopathology* 53:260-264.
- Selman, I.W., Buckley, W.R. 1959. Factors affecting the invasion of young tomato plant roots by *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society* 42:227-234.
- Serrhini, M.N., Zeroual, A. 1995. *Verticillium* wilt in Morocco. *Olivae* 58:58-61.
- Shigo, A.L., 1984. Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology* 22:189-214.
- Shun, K., Hisashi, K., Hayato, M., Takanori, K. 2012. Symbiotic fungal flora in leaf galls induced by *Illiciomyia yukawai* (Diptera: eciatomyiidae) and in its mycangia. *Microbial Ecology* 63:619-627.
- Silvestri, F. 1945. Contribution à la biologie de la petite cécidomyie des olives (*Prolasioptera berlesiana* Paoli) en Italie. *International Bulletin of Plant Protection, Rome* 19:73-76.

- Sinclair, W.A., Lyon, H.H., Johnson, W.T. 1987. Diseases of trees and shrubs. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. Ithaca and London, 575 pp.
- Six, D.L. 2003. Bark beetle-fungus symbioses. En: Insect symbiosis, (Bourtzis, K., Miller, T.A. eds.), Chemical Rubber Company Press, New York, pp. 97-114.
- Skadow, K. 1969. Untersuchungen über die welkeerreger *Verticillium albo-atrum* Rke. et Berth. und *V. dahliae* Kleb. II. Unkräuter als Infektionsreservoir. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 123:736-765.
- Skipp, R.A., Christensen, M.J., Nan, Z.B. 1986. Invasion of red clover (*Trifolium pratense*) roots by soilborne fungi. New Zealand Journal of Agricultural Research 29:305-313.
- Skuhrová, M., Skuhrový, V. 1997. Gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) of Greece. Entomologica, Bari 31:13-75.
- Slippers, B., Wingfield, M.J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews 21:90-106.
- Smith, L.D. 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahlia* and *V. tricorpus*. New Zealand Journal of Agricultural Research 8:450-478.
- Smith, H., Wingfield, M.J., Crous, P.W., Coutinho, T.A. 1996. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus spp.* and *Eucalyptus spp.* in South Africa. South African Journal of Botany 62:86-88.
- Snyder, W.C., Hansen, H.N., Wilhelm, S. 1950. New host of *Verticillium albo-atrum*. Plant Disease Report 34:26-27.
- Snyder, W.C., Smith, S.N. 1981. Current status. En: Fungal wilt diseases of plants, (Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. eds.). Academic press, New York, pp. 25-50.

- Solinas, M. 1967. Osservazioni biologiche condotte in Puglia sulla *Prolasioptera berlesiana* (Paoli), noc particolare riferimento au rapporti simbiotici col *Dacus oleae* (Gmelin) a noc la *Sphaeropsis dalmatica* (Thüm.) Gigante. *Entomologica* 3:129-176.
- Southwood, T.R.E. 1973. The insect/plant relationship an evolutionary perspective. En: *Insect/plant relationships*, (Van Emden, H.F. eds.), John Wiley and Sons, New York, pp. 3-41.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. 1985. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Mcgraw-Hill, México, 622 pp.
- Swart, W.J., Wingfield, M.J. 1991. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease* 75:761-766.
- Thanassouloupoulos, C.C. 1993. Spread of *Verticillium* wilt by nursery plants in olive groves in the Halkidiki, Greece. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin* 23: 517-520.
- Thanassouloupoulos, C.C., Biris, D.A., Tjamos, E.C. 1979. Survey of *Verticillium* wilt of olive tree in Greece. *Plant Disease Reporter* 63:936-940.
- Thanassouloupoulos, C.C., Biris, D.A., Tjamos, E.C. 1981. Dissemination of *Verticillium* propagules in olive orchards by irrigation water. 5th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Patras, Greece, pp. 52-53.
- Thorpe, K.W., Mastro, V.C., Leonard, D.S., Leonhardt, B.A., Mclane, W. 1999. Comparative efficacy of two controlled-release gypsy moth mating disruption formulations. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 90:267-277.
- Tiberi, R., Ragazzi, A. 1998. Association between fungi and xylophagous insects of declining oaks in Italy. *Redia* 81:83-91.
- Tjamos, E.C. 1993. Prospects and strategies in controlling *Verticillium* wilt of olive. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin* 23:505-512.

- Tjamos, E.C., Biris, D.A., Paplomatas, E.J. 1991. Recovery of olive trees from *Verticillium* wilt after individual application of soil solarisation in established olive orchards. *Plant Disease* 75:557-562.
- Tjamos, E.C., Botseas, D. 1987. Occurrence of *Verticillium dahliae* in leaves of *Verticillium*-wilted olive trees. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9:86.
- Tjamos, E.C., Tsougriani, H. 1990. Formation of *Verticillium dahliae* microsclerotia in partially disintegrated leaves of *Verticillium* affected olive trees. 5th International *Verticillium* Symposium, Leningrad, Soviet Union, 20 pp.
- Trapero, C., Birem, F., Abho-Sheker, F.M., Caballero, J., Mercado-Blanco, J., Del Río, C., Trapero-Casas, A., Martos-Moreno, C., Raya-Ortega, M.C., Arquero, O., Serrano, N., Molina, M., Alcántara, E., Muñoz-Díez, C., Rallo, L., Barranco, D., Roca, L., Moral, J., Blanco-López, M.A., López-Escudero, F.J. 2010. Avances en la resistencia del olivo a la Verticilosis causada por *Verticillium dahliae*. *Vida Rural* 316:36-44.
- Trapero-Casas, A., Blanco-López, M.A. 2010. Diseases. En: Olive growing, (Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. eds.), Junta de Andalucía y Ediciones Mundi Prensa, Madrid, pp 521-578.
- Trapero, C., Muñoz-Díez C., Rallo, L., López-Escudero, F.J., Barranco, D. 2012b. EL Programa de mejora del olivo por resistencia a la Verticilosis. XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Málaga, España, 183 pp.
- Trapero, C., Raya-Ortega, C., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J. López-Escudero, F.J. 2012a. Comparación de la población de *Verticillium dahliae* en suelo y en árboles infectados en plantaciones de olivo. XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Málaga, España, 301 pp.
- Trapero, C., Roca, L.F., Alcantara, E., Lopez-Escudero, F.J. 2011. Colonization of olive inflorescences by *Verticillium dahliae* and its significance for pathogen spread. *Journal of Phytopathology* 159:638-640.

- Tremblay, E. 1990. Generalità e mezzi di controllo. (4° eds.) Napoli, Liguori, 224 pp.
- Tsrer, L., Levin, E.G. 2003. Vegetative compatibility and pathogenecity of *Verticillium dahliae* Kleb. isolation from israel. Journal of Phytopathology 151:451-455.
- Tzanakakis, M.E. 2005. Olive fruit fly, *Bactrocera oleae* Rossi (= *Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). Encyclopedia of Entomology, pp. 1589-159.
- Tzanakakis, M.E. 2006. Insects and mites feeding on olive. Boston, Brill, 182 pp.
- Upadhyay, H.P. 1993. Classification of the ophiostomatoid fungi. En: *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology and pathogenicity (Wingfield, M.J., Seifert, K.A., Webber, J.F. eds.), American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota, pp. 7-13
- Uremis, I. 2005. Determination of weed species and their frequency and density in olive groves in Hatay province of Turkey. Pakistan Journal of Biological Sciences 8:164-167.
- Vargas-Machuca, R., Martin, C., Galindez, W. 1987. Recovery of *Verticillium dahliae* from weed plants in farmers' fields in Peru. Plant Disease 71:756-758.
- Vega, F.E., Mercadier, G., Dowd, P.F. 1999. Fungi associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). 18th International Scientific Colloquium on Coffee, Helsinki. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), pp. 229-238.
- Verona, O. 1952. Notizie sopra una dannosa micosi delle olive. Abstract en Review of Plant Pathology (1954) 33:307.
- Viggiani, G., Sasso, R. 2008. *Lasioptera berlesiana* not a "danger" to olives. Informatore Agrario 64:54-56.

- Vigouroux, A. 1975. *Verticillium dahliae* agent d'un dépérissement de l'olivier en France. Annual of Phytopathology 7:37-44.
- Vossen, P., Varela, L., Devarenne, A. 2004. Olive fruit fly. University of California cooperative extension Sonoma County, California.
<http://ucce.ucdavis.edu/files/filelibrary/1650/14355.pdf>
- Webber, J.F. 2004. Experimental studies on factors influencing the transmission of Dutch elm disease. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales 13:197-205.
- Webber, J.F., Gibbs, J.N. 1989. Insect dissemination of fungal pathogens of trees. En: Insect-fungus interactions. (Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. eds.), Academic Press, New York, pp. 161-193.
- Weems, H.V., Nation, J.L., 2003. Mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Insecta: Diptera: Tephritidae). University of Florida, Dpi, Entomology Circular N° 44.
http://creatures.ifas.ufl.edu/fruit/tropical/olive_fruit_fly.htm
- Wilhelm, S. 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. Phytopathology 45:180-181.
- Wilhelm, S., Taylor, J.B. 1965. Control of *Verticillium* wilt of olive through natural recovery and resistance. Phytopathology 55:310-316.
- Wingfield, M.J., Harrington, T.C., Solheim, H. 1997. Two species in the *Ceratocystis coerulea* complex from conifers in western North America. Canadian Journal of Botany 75:827-834.
- Wingfield, M., Seifert, K., Webber, J. 1993. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. American Phytopathological Society, Minnesota, 293 pp.
- Wollenweber, H.W., Stapp, C. 1928. Untersuchungen über die als Ulmensterben bekannte Baumkrankheit. Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft 16:283-324.

- Wood, S.L., Stevens, G.C., Lezama, H.J. 1992. Los Scolytidae (Coleoptera) de Costa Rica: Clave de la subfamilia Scolytinae, Tribu Corthylini. *Revista de Biología Tropical* 40:247-286.
- Xiao, C.L., Subbarao, K.V. 2000. Effects of irrigation and *Verticillium dahliae* on cauliflower root and shoot growth dynamics. *Phytopathology* 90:995-1004.
- Xiao, C.L., Subbarao, K.V., Schulbach, K.F., Koike, S.T. 1998. Effects of crop rotation and irrigation on *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil and wilt in cauliflower. *Phytopathology* 88:1046-1055.
- Yildiz, A., Dogan, M.N., Boz, O., Benlioglu, S. 2009. Weed host of *Verticillium dahliae* in cotton fields and characterization of *V. dahliae* isolates from weeds. *Phytoparasitica* 37:171-178.
- Yukawa, J., Haituka, S. 1994. A new cecidomyiid successor (Diptera) inhabiting empty midge galls. *Japanese Journal of Entomology* 62:709-718.
- Yukawa, J., Rohfritsch, O. 2005. Biology and ecology of gall-inducing cecidomyiidae (Diptera). En: *Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods*, (Raman, A., Schaefer, C.W., Withers, T.M. eds.), Plymouth, Science Publishers, pp. 273-304.
- Zachos, D.G. 1963. La verticilliose de l'oliver en Grèce. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki (N.S.)* 5:105-107.
- Zalom, F.G., Van Steenwyk, R.A., Burrack, H.J. 2003. Olive fruit fly. *Pest Notes*. University of California statewide IPM program, *Pest Notes Publication* 74:1-12.

Anejo

Análisis estadístico de los datos

2.2. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picada de mosca viva y no viva.

Tabla 16. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* en picada viva y no viva de *Bactrocera oleae* en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo recogidas durante las campañas 2009, 2010 y 2011 y observadas en el laboratorio

Campaña 2009

Gordal

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence

Case	Variable		
	CON	SIN	
1	Observed	8	576
	Expected	132.41	451.59
	Cell Chi-Sq	116.89	34.27
2	Observed	199	130
	Expected	74.59	254.41
	Cell Chi-Sq	207.49	60.84
	207	706	913
Overall Chi-Square 419.49			
P-Value 0.0000			
Degrees of Freedom 1			

Cases Included 4 Missing Cases 0

Hojiblanca

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence

Case	Variable		
	CON	SIN	
1	Observed	11	932
	Expected	73.64	869.36
	Cell Chi-Sq	53.28	4.51
2	Observed	87	225
	Expected	24.36	287.64
	Cell Chi-Sq	161.03	13.64
	98	1157	1255
Overall Chi-Square 232.47			
P-Value 0.0000			
Degrees of Freedom 1			

Cases Included 4 Missing Cases 0

Picudo**Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence**

Case	Variable		
	CON	SIN	
1	Observed	0	145
	Expected	10.03	134.97
	Cell Chi-Sq	10.03	0.74
2	Observed	13	43
	Expected	2.97	40.03
	Cell Chi-Sq	33.81	2.51
	13	175	188

Overall Chi-Square 47.09

P-Value 0.0000

Degrees of Freedom 1

CAUTION: 1 cell(s) have expected values less than 5.0

Cases Included 4 Missing Cases 0

Campaña 2010**Gordal****Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence**

Case	Variable		
	CON	SIN	
1	Observed	6	144
	Expected	26.02	117.98
	Cell Chi-Sq	15.41	3.40
2	Observed	69	271
	Expected	48.98	222.02
	Cell Chi-Sq	8.19	1.81
	75	340	415

Overall Chi-Square 28.80

P-Value 0.0000

Degrees of Freedom 1

Cases Included 4 Missing Cases 0

Hojiblanca**Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence**

Case	Variable		
	CON	SIN	
1	Observed	0	53
	Expected	10.01	42.99
	Cell Chi-Sq	10.01	2.33
2	Observed	17	37
	Expected	6.99	30.01
	Cell Chi-Sq	14.34	3.34
	17	73	90

Overall Chi-Square 30.02

P-Value 0.0000

Degrees of Freedom 1

Cases Included 4 Missing Cases 0

Picudo**Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence**

Case	Variable		
	CON	SIN	
1	Observed	0	29
	Expected	3.82	25.18
	Cell Chi-Sq	3.82	0.58
2	Observed	5	9
	Expected	1.18	7.82
	Cell Chi-Sq	12.30	1.86
	5	33	38

Overall Chi-Square 18.55

P-Value 0.0000

Degrees of Freedom 1

CAUTION: 2 cell(s) have expected values less than 5.0

Cases Included 4 Missing Cases 0

Campaña 2011
Gordal**Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence**

Case	Variable		
	CON	SIN	
1	Observed	6	271
	Expected	100.61	176.39
	Cell Chi-Sq	88.97	50.75
2	Observed	152	6
	Expected	57.39	100.61
	Cell Chi-Sq	155.98	88.97
	158	277	435

Overall Chi-Square 384.66

P-Value 0.0000

Degrees of Freedom 1

Cases Included 4 Missing Cases 0

3.1. Incidencia del Escudete (*Botryosphaeria dothidea*) en las picadas de mosca (*Bactrocera oleae*).

Tabla 39. Incidencia de *Botryosphaeria dothidea* (Escudete) en aceitunas de las variedades Gordal, Hojiblanca y Picudo con picada de mosca en ausencia del cecidómido, observadas en campo durante la campaña 2010.

Gordal

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence

Case		Variable		
		CON	SIN	
1	Observed	385	373	758
	Expected	19.88	738.12	
	Cell Chi-Sq	6705.76	180.61	
2	Observed	5	14107	14112
	Expected	370.12	13741.9	
	Cell Chi-Sq	360.19	9.70	
		390	14480	14870

Overall Chi-Square 7256.25

P-Value 0.0000

Degrees of Freedom 1

Cases Included 4 Missing Cases 0

Hojiblanca

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence

Case		Variable		
		CON	SIN	
1	Observed	1	323	324
	Expected	0.02	323.98	
	Cell Chi-Sq	47.31	0.00	
2	Observed	0	15646	15646
	Expected	0.98	15645.0	
	Cell Chi-Sq	0.98	0.00	
		1	15969	15970

Overall Chi-Square 48.29

P-Value 0.0000

Degrees of Freedom 1

CAUTION: 2 cell(s) have expected values less than 1.0

Cases Included 4 Missing Cases 0

Picudo**Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence**

Case	Variable	
	CON	SIN
1	Observed	4
	Expected	0.01
	Cell Chi-Sq	1855.42
2	Observed	30
	Expected	33.99
	Cell Chi-Sq	0.47
2	Observed	0
	Expected	3.99
	Cell Chi-Sq	3.99
		4
		15835
		15839

Overall Chi-Square 1859.88

P-Value 0.0000

Degrees of Freedom 1

CAUTION: 1 cell(s) have expected values less than 1.0

Cases Included 4 Missing Cases 0

Table 25. Incidencia de *Botryosphaeria dothidea* (Escudete) en aceitunas con picadas de mosca sin cecidómido y en aceitunas sin picada en muestras recogidas durante la campaña 2010

Gordal

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence

Case		Variable		
		CON	SIN	
1	Observed	21	464	485
	Expected	67.02	417.98	
	Cell Chi-Sq	31.60	5.07	
2	Observed	93	247	340
	Expected	46.98	293.02	
	Cell Chi-Sq	45.07	7.23	
		114	711	825

Overall Chi-Square 88.97
P-Value 0.0000
Degrees of Freedom 1
Cases Included 4 Missing Cases 0

Hojiblanca

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence

Case		Variable		
		CON	SIN	
1	Observed	36	774	810
	Expected	38.53	771.47	
	Cell Chi-Sq	0.17	0.01	
2	Observed	6	67	73
	Expected	3.47	69.53	
	Cell Chi-Sq	1.84	0.09	
		42	841	883

Overall Chi-Square 2.11
P-Value 0.1467
Degrees of Freedom 1

CAUTION: 1 cell(s) have expected values less than 5.0

Cases Included 4 Missing Cases 0

Picudo**Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence**

Case	Variable		
	CON	SIN	
1	Observed	32	637
	Expected	33.28	
	Cell Chi-Sq	0.05	
2	Observed	3	33
	Expected	1.72	
	Cell Chi-Sq	0.94	
	35	635	670

Overall Chi-Square 1.05

P-Value 0.3059

Degrees of Freedom 1

CAUTION: 1 cell(s) have expected values less than 5.0

Cases Included 4 Missing Cases 0

Tabla 35. Número de galerías de alimentación por árbol producido por adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* en árboles sanos de olivo en el Experimento II desde Mayo a Junio de 2009.

Statistix 8.0
12:13:54

análisis de ensayo, 28/04/2012,

Analysis of Variance Table for entradas

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamien	2	165828	82913.8	18.79	0.0000
Error	31	136815	4413.4		
Total	33				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 156.02 CV 42.58

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for Tratamien

Tratamien	Mean	Homogeneous Groups
testigo	261.50	A
1	164.19	A
2	42.37	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
Critical T Value 2.040 Critical Value for Comparison VARIES
Error term used: Error, 31 DF
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

Analysis of Variance Table for entradas

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamien	1	118706	118706	26.08	0.0000
Error	30	136550	4552		
Total	31	255256			

Grand Mean 103.28 CV 65.32

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for Tratamien

Tratamien	Mean	Homogeneous Groups
1	164.19	A
2	42.38	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 23.853
Critical T Value 2.042 Critical Value for Comparison 48.714
Error term used: Error, 30 DF
All 2 means are significantly different from one another.

Entradas por Rep.**T1**

Statistix 8.0
12:18:06

analisis de ensayo, 28/04/2012,

Analysis of Variance Table for entradas

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	3	4678	1559.23	0.18	0.9094
Error	12	105281	8773.40		
Total	15	109958			

Grand Mean 164.19 CV 57.05

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for Rep

Rep	Mean	Homogeneous Groups
2	186.00	A
4	169.75	A
1	162.50	A
3	138.50	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 66.232

Critical T Value 2.179 Critical Value for Comparison 144.31

Error term used: Error, 12 DF

There are no significant pairwise differences among the means.

T2**Analysis of Variance Table for entradas**

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	3	1628.7	542.92	0.26	0.8521
Error	12	24963.0	2080.25		
Total	15	26591.8			

Grand Mean 42.375 CV 107.63

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for Rep

Rep	Mean	Homogeneous Groups
3	58.500	A
4	42.500	A
2	37.000	A
1	31.500	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 32.251

Critical T Value 2.179 Critical Value for Comparison 70.269

Error term used: Error, 12 DF

There are no significant pairwise differences among the means.

Source	DF	SS	MS	F	P
TRATAMIEN	2	879.915	439.957	60.91	0.0000
Error	69	498.405	7.223		
Total	71				

Grand Mean 9.3175 CV 28.84

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for TRATAMIEN

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
Critical T Value 1.995 Critical Value for Comparison VARIES
Error term used: Error, 69 DF
All 3 means are significantly different from one another.

Source	DF	SS	MS	F	P
TRATAMIEN	1	280.519	280.519	37.79	0.0000
Error	64	475.071	7.423		
Total	65				

Grand Mean 5.6429 CV 48.28

Alpha	0.05	Standard Error for Comparison	VARIABLE
Critical T Value	1.998	Critical Value for Comparison	VARIABLE
Error term used: Error, 64 DF			
All 2 means are significantly different from one another.			

Entradas por Rep.**T1**

Statistix 8.0
13:05:58

2009-2010 ram final, 28/04/2012,

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for REP

REP	Mean	Homogeneous Groups
1	8.8889	A
4	8.8333	A
3	7.4167	AB
2	5.7778	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 2.024 Critical Value for Comparison VARIES
 Error term used: Error, 38 DF
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Analysis of Variance Table for entradas

Source	DF	SS	MS	F	P
REP	3	62.044	20.6812	2.82	0.0520
Error	38	279.028	7.3428		
Total	41				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 7.7292 CV 35.06

T2**Analysis of Variance Table for entradas**

Source	DF	SS	MS	F	P
REP	3	48.1667	16.0556	3.74	0.0278
Error	20	85.8333	4.2917		
Total	23				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 2.6667 CV 77.69

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for REP

REP	Mean	Homogeneous Groups
3	4.8333	A
4	2.8333	AB
2	1.6667	B
1	1.3333	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 2.086 Critical Value for Comparison VARIES
 Error term used: Error, 20 DF
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Tabla 37. Número de galerías de alimentación y puesta producidas por adultos de *Phloeotribus scarabaeoides* en árboles sanos de olivo en el Experimento III desde Octubre de 2010 a Junio de 2011.

Analysis of Variance Table for ENTRADAS

Source	DF	SS	MS	F	P
TRATAMIEN	2	823.750	411.875	9.71	0.0020
Error	15	636.250	42.417		
Total	17				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 41.417 CV 15.73

LSD All-Pairwise Comparisons Test of ENTRADAS for TRATAMIEN

TRATAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
5	50.000	A
3	41.500	B
4	32.750	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES

Critical T Value 2.131 Critical Value for Comparison VARIES

Error term used: Error, 15 DF

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tabla 38. Número de galerías de alimentación y de puesta por rama producidas por *Phloeotribus scarabaeoides* en árboles sanos de olivo en el Experimento III desde Noviembre de 2011 a Marzo de 2012.

Analysis of Variance Table for entradas

Source	DF	SS	MS	F	P
TRATAMIEN	2	200.014	100.007	25.59	0.0000
Error	51	199.319	3.908		
Total	53				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 5.6898 CV 34.74

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for TRATAMIEN

TRATAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
5	8.2083	A
3	5.4444	B
4	3.4167	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES

Critical T Value 2.008 Critical Value for Comparison VARIES

Error term used: Error, 51 DF

All 3 means are significantly different from one another.

Entradas Por Rep.

T3

Analysis of Variance Table for entradas

Source	DF	SS	MS	F	P
ARBOL	5	21.7778	4.35556	1.23	0.3558
Error	12	42.6667	3.55556		
Total	17	64.4444			

Grand Mean 5.4444 CV 34.63

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for ARBOL

ARBOL	Mean	Homogeneous Groups
1	6.0000	A
2	6.0000	A
3	6.0000	A
5	6.0000	A
6	5.6667	A
4	3.0000	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.5396

Critical T Value 2.179 Critical Value for Comparison 3.3545

Error term used: Error, 12 DF

There are no significant pairwise differences among the means.

T 4**Analysis of Variance Table for entradas**

Source	DF	SS	MS	F	P
ARBOL	3	2.2500	0.75000	0.69	0.5820
Error	8	8.6667	1.08333		
Total	11	10.9167			
Grand Mean	3.4167	CV 30.46			

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for ARBOL

ARBOL	Mean	Homogeneous Groups
2	4.0000	A
4	3.6667	A
1	3.0000	A
3	3.0000	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.8498
Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 1.9597
Error term used: Error, 8 DF
There are no significant pairwise differences among the means.

T5**Analysis of Variance Table for entradas**

Source	DF	SS	MS	F	P
ARBOL	7	15.292	2.18452	0.32	0.9331
Error	16	108.667	6.79167		
Total	23	123.958			

Grand Mean 8.2083 CV 31.75

LSD All-Pairwise Comparisons Test of entradas for ARBOL

ARBOL	Mean	Homogeneous Groups
2	9.0000	A
7	9.0000	A
5	8.6667	A
4	8.3333	A
6	8.3333	A
3	8.0000	A
8	8.0000	A
1	6.3333	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.1279
Critical T Value 2.120 Critical Value for Comparison 4.5109
Error term used: Error, 16 DF
There are no significant pairwise differences among the means.